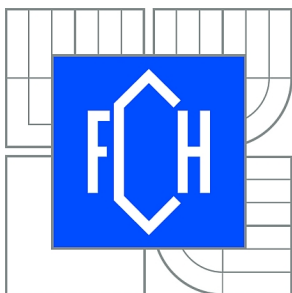




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PRO IZOLACI DNA

THE USE OF MAGNETIC MICROPARTICLES FOR DNA ISOLATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Mgr. ZDENĚK JELÍNEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0594/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Mgr. Zdeněk Jelínek	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Využití magnetických mikročástic pro izolaci DNA

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Mgr. Zdeněk Jelínek
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V rámci diplomové práce byla studována efektivita magnetických mikročástic při izolaci DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T a DNA z kuřecích erytrocytů. K izolaci byly použity magnetické mikročástice na bázi HEMA, pokryté karboxylovými skupinami, a hypersíťované styren-divinylbenzenové částice (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha). Jako kontrola byly použity komerční magnetické mikročástice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (DynaL, Norsko) na bázi polystyrenu a částice MPG® Uncoated (PureBiotech, USA) na bázi magnetického skla.

Sledována byla závislost množství izolované DNA na výchozí koncentraci DNA v roztoku a závislost množství izolované DNA na koncentraci magnetických mikročástic. Rovněž byla sledována afinita magnetických mikročástic k RNA a to pro různé výchozí koncentrace RNA v roztoku. Testované nosiče byly použity při izolaci DNA z reálného vzorku (mléčný výrobek Actimel). Kvalita separované DNA rodu *Lactobacillus* byla prokázána pomocí rodově specifické PCR.

ABSTRACT

The effectiveness of magnetic microparticles in isolation of DNA from *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T and DNA from chicken erythrocytes were studied in diploma thesis. Magnetic HEMA based microparticles coated by carboxylic groups and hyperbranched styrene-divinylbenzene particles (IMC AS ČR, Prague, Czech Republic) were used for DNA isolation. Magnetic microparticles Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (DynaL, Norway) based on polystyrene and MPG® Uncoated (PureBiotech, USA) based on magnetic glass were used as a control.

The dependence of amount of eluted DNA on concentration of DNA in the base solution and the dependence of amount of eluted DNA on concentration of magnetic microparticles were studied. The affinity of magnetic microparticles to RNA for various concentrations of RNA solution was studied, too. The ability of tested particles to isolate DNA from real samples was validated using milk product Actimel.

The quality of isolated DNA of *Lactobacillus* genus was proved using genus specific PCR.

KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické nosiče, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR).

KEYWORDS

Magnetic particles, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR).

JELÍNEK, Z. *Využití magnetických mikročástic pro izolaci DNA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 76 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za velké množství odborných rad a připomínek a za velmi cennou podporu. Své poděkování směřuji také doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za vedení, rady, připomínky i všestrannou podporu při řešení a zpracování diplomové práce a Mgr. Kristýně Turkové za významnou pomoc při měření k diplomové práci.

OBSAH

Úvod	7
Teoretická část	8
1 Izolace DNA	8
1.1 Fenol-chloroformová extrakce	8
1.2 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů	8
1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin	11
1.4 Agarózová gelová elektroforéza	12
2 Bakterie v mlékárenství a potravinářském průmyslu	13
2.1 Bakterie v mlékařském průmyslu	13
2.2 Bakterie v masném průmyslu	13
2.3 Probiotika	14
3 Identifikace bakterií	17
3.1 Kultivační (klasické) metody	17
3.2 Nekultivační metody	17
Cíl práce	20
Experimentální část	21
4 Materiál	21
4.1 Bakteriální buňky	21
4.2 Purifikovaná RNA	21
4.3 Chemikálie	21
4.4 Magnetické mikročástice	22
4.5 Roztoky	22
4.6 Komponenty pro PCR	23
4.7 Přístroje a pomůcky	24
4.8 Testované potravinové výrobky	24
5 Metody	26
5.1 Kultivace bakteriálních buněk	26
5.2 Spektrofotometrické měření optické hustoty bakteriálních buněk	26
5.3 Lyze buněk	26
5.4 Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů	26
5.5 Fenol-chloroformová extrakce DNA	27
5.6 Příprava DNA o různé koncentraci	27
5.7 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic	27
5.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	27
5.9 Příprava RNA o různé koncentraci	27

5.10	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA	28
5.11	PCR s purifikovanou DNA.....	28
5.12	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR	28
Výsledky		29
6	Výběr a kultivace bakteriálních kmenů	29
6.1	Kultivace bakteriálních buněk.....	29
6.2	Kontrola čistoty bakteriální kultury <i>L. rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	29
6.3	Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce30	
6.4	Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty DNA.....	30
6.5	Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	30
7	Testování magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace	33
7.1	Příprava hrubých lyzátů buněk	33
7.2	Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce	34
7.3	Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic	35
7.4	Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA.....	37
7.5	Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	38
8	Testování různých množství magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace.....	40
8.1	Příprava hrubých lyzátů buněk	40
8.2	Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce	41
8.3	Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic různých koncentrací.....	43
8.4	Porovnání testovaných magnetických částic o různých koncentracích při separaci DNA	45
8.5	Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	47
9	Testování magnetických mikročastic jedné koncentrace při izolaci DNA různých koncentrací.....	49
9.2	Izolace různých koncentrací DNA pomocí magnetických mikročastic.....	50
9.3	Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA o různých koncentracích	52
10	Určení afinity magnetických mikročastic k RNA	54
10.1	Testování množství RNA eluované z magnetických mikročastic.....	54
10.2	Porovnání testovaných magnetických částic při separaci RNA o různých koncentracích	56
10.3	Porovnání testovaných magnetických částic při separaci RNA o různých koncentracích	57
11	Porovnání různých druhů magnetických částic při izolaci DNA z mléčných výrobků 59	
11.1	Mléčný výrobek Actimel	59

11.2	Doplněk stravy Linex® Forte.....	62
	Diskuze.....	65
12	Výběr a kultivace bakteriálních kmenů.....	65
13	Testování magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace.....	65
14	Testování různých množství magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace.....	66
15	Testování magnetických mikročastic jedné koncentrace při izolaci DNA různých koncentrací.....	66
16	Určení afinity magnetických mikročastic k RNA	67
17	Porovnání různých druhů magnetických částic při izolaci DNA z mléčných výrobků	67
	Závěr	68
	Seznam použitých zdrojů.....	69
	Seznam použitých zkratk a symbolů	75
	Seznam příloh.....	76

ÚVOD

Fermentace patří k nejstarším metodám zpracování potravin. Chléb, máslo, sýr, pivo i víno existovaly již v dobách dávno před naším letopočtem. Díky svým nutričním hodnotám, chuti a aroma si fermentované potraviny udržují své místo i v moderním jídelníčku.

Fermentace je prakticky jedinou možností, jak levně a přitom efektivně konzervovat potraviny v rozvojových zemích tropické Afriky, Asie i Ameriky, kde obyvatelstvo nemá možnost skladovat jídlo v lednicích a mrazicích boxech. Při fermentaci dochází k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů a někdy také k odstranění toxických látek z potravin. Současně s prodloužením doby trvanlivosti přináší tento způsob zpracování potravin hodnotné aroma, zvyšuje stravitelnost a působí pozitivně na lidský organismus [1].

Na rozdíl od mikrobiální kontaminace představuje fermentace žádoucí proces. Působením biochemické aktivity plísní, kvasinek či bakterií dochází ke štěpení cukrů, tuků, bílkovin i dalších složek, což zlepšuje stravitelnost a zvyšuje nutriční hodnotu potravin. Mikroorganismy obohacují potraviny o charakteristické látky, jako jsou organické kyseliny, aldehydy, estery či alkoholy. Některé bakterie také produkují vitamíny [1].

Poslední desetiletí se pozornost věnuje zejména skupině bakterií mléčného kvašení a probiotickým bakteriím. Probiotika mají schopnost snižovat výskyt průjmů a zmírňovat průběh průjemových onemocnění, stimulují imunitu, chrání proti rakovině tlustého střeva a zmírňují potravinové alergie [2][3].

Izolace a identifikace bakterií v potravinách se provádí molekulárně-biologickými metodami. Klasické metody využívají k izolaci DNA toxická organická rozpouštědla, vyžadují časově náročnou centrifugaci, je velmi obtížné provést jejich automatizaci a není možné je použít pro extrakci DNA z malých množství vzorků. Žádným z výše uvedených neduhů netrpí metoda izolace DNA pomocí magnetických mikro- a nanočástic [4].

Mikro- a nanočástice obsahují navázané ligandy, které určují, jaká skupina molekul (DNA, RNA, proteiny) nebo buněk se bude částicemi izolovat. Funkcionalizované magnetické nosiče se s úspěchem používají pro izolaci DNA z komplexních vzorků.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Izolace DNA

Izolace genomové DNA v požadované kvalitě je základním předpokladem řady molekulárně diagnostických metod. Vedle odběru a stabilizace vzorku patří lyze buněk a purifikace DNA ke klíčovým krokům celé analýzy DNA. Chyba při purifikaci často ohrozí výsledky PCR nebo DNA hybridizace.

V posledních letech došlo k rozšíření komerčních kitů, které jsou optimalizovány pro izolaci DNA ze specifických typů vzorků a současně minimalizují použití toxických chemikálií. Jejich výhodami jsou také lepší reprodukovatelnost a nízké nároky na optimalizaci. Nevýhodou jsou naopak vyšší náklady na analýzu [1]. Základem celé řady kitů jsou funkcionalizované magnetické mikro- a nanočástice.

1.1 Fenol-chloroformová extrakce

Princip fenol-chloroformové extrakce je založen na schopnosti fenolu denaturovat a precipitovat proteiny z vodného roztoku. Izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce je velmi účinná, k dosažení čistoty dostatečné k provedení PCR stačí obvykle dvě až tři extrakce fenolem [5].

Fenol-chloroformová extrakce patří k nejstarším metodám izolace nukleových kyselin. Princip popsal Kirby v roce 1956, poté, co deproteinizačních účinků fenolu využil k extrakci RNA z homogenizované savčí tkáně [6]. DNA zůstala vázána v proteinové mezivrstvě. Když nahradil vodu roztokem solí, přešla do vodné fáze také DNA [5]. Ačkoliv byly později soli nahrazeny detergenty, zejména dodecylsulfátem sodným (SDS), používá se Kirbyho metoda dodnes prakticky beze změn.

Při extrakci nukleových kyselin fenolem je zásadní hodnota pH. Při slabě zásaditém pH fenolu (obvykle 7,8) nedochází k denaturaci DNA, ale k extrakci DNA do vodné fáze spolu s RNA. Kyselé pH fenolu (obvykle 4,8–5,2) a použití čisté vody jako rozpouštědla způsobuje, že do vodné fáze přechází pouze RNA a DNA se stává součástí proteinové mezivrstvy. V obou případech vytvářejí denaturované proteiny vrstvu mezi vodnou a organickou fází a lipidy přecházejí do organické fáze [7].

Purifikovaný fenol má relativní hustotu 1,07, a proto tvoří po smísení s vodou spodní fázi. Pokud ovšem analyt obsahuje velké koncentrace rozpuštěných látek, může dojít k inverzi fází. V tom případě se doporučuje fenol smísit s chloroformem v poměru 1:1 (relativní hustota chloroformu je 1,47, chloroform tedy zajistí správnou separaci směsi) [7].

1.2 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

Magnetické nosiče jsou tvořeny magnetickým jádrem, které zajišťuje magnetické vlastnosti nosičů, a nemagnetickou polymerní maticí z inertního a biokompatibilního materiálu, která chrání jádro nosiče před kontaktem s analytem, zajišťuje biokompatibilitu nosičů a umožňuje navázání funkčních molekul pro imobilizaci separované látky [8][9].

1.2.1 Požadavky na vlastnosti magnetických nosičů

Separční schopnosti magnetických nosičů jsou výrazně ovlivněny tvarem, velikostí, složením, morfologií i typem a množstvím funkčních skupin. Nepravidelně tvarované částice jsou náchylnější k mechanickému poškození než kulovité částice a při pipetování by mohlo dojít k jejich rozlomení. Kulovité částice jsou výhodnější z hlediska hydrodynamických vlastností [9].

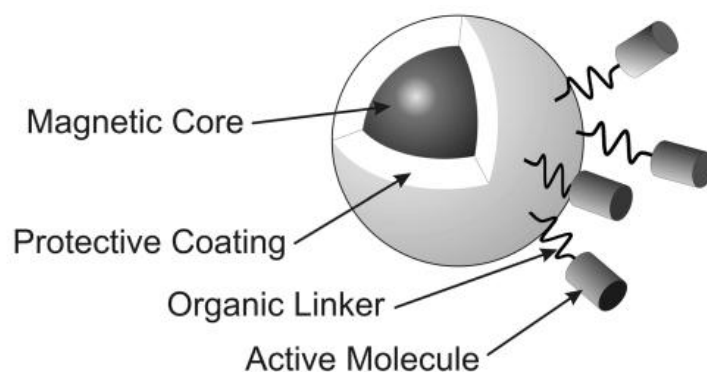
Velice důležitá je velikost a rozložení velikosti částic. Magnetické nosiče by měly být monodisperzní, s jednotnou velikostí částic nebo polydisperzní s úzkou distribucí velikosti

částic. Monodisperzní částice si uchovávají jednotné fyzikální a chemické vlastnosti a v roztoku nevytvářejí shluky tak snadno jako polydisperzní částice. Magnetické nosiče s velkým průměrem mají vzhledem k objemu malý specifický povrch pro navázání funkčních skupin [9].

1.2.2 Magnetické jádro

Jádro mikro- a nanočástic musí být tvořeno superparamagnetickými materiály, které vykazují magnetismus pouze v přítomnosti magnetického pole. Tento požadavek je velmi důležitý, neboť zajišťuje, aby nosiče nevykazovaly zbytkový magnetismus a bez působení magnetického pole nedocházelo k jejich agregaci a vytváření shluků. V roztoku musí nosiče naopak tvořit homogenní suspenzi.

Magnetické jádro je obvykle tvořeno krystaly oxidů železa, např. maghemitem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) či magnetitem (Fe_3O_4 , $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$), nebo slitinami kovů skupiny přechodných prvků, např. železem, kobaltem, niklem, zinkem nebo hořčíkem. Výhodou oxidů železa oproti slitinám železa je vyšší stabilita před oxidací [8].



1-1 Schéma magnetického nosiče [12 str. 170]

Velikost magnetických částic se pohybuje v jednotkách nanometrů až mikrometrů. Průměr nanočástic bývá 10–20 nm, průměr mikročástic leží v rozmezí 0,1–100 μm [10]. Částice s malým průměrem jádra mají sice větší specifický povrch vhodný pro navázání aktivních skupin, ale jsou méně citlivé na působení vnějšího magnetického pole [9][10].

1.2.3 Polymerní matrice

Magnetické jádro nano- a mikročástic má velký poměr povrchu k objemu, a proto je mnohem reaktivnější než běžné materiály. Pro zajištění stability jádra, biokompatibility, vazby biologicky významných látek a zamezení nežádoucích a nespecifických interakcí s organickými i anorganickými složkami v prostředí je výhodné pokrýt jádro matricí [11][12].

Matrice nosičů se vyrábějí převážně z přírodních nebo syntetických polymerů, využít lze také některé organické a anorganické sloučeniny, např. oxid křemičitý, uhlík nebo zlato [11].

Přírodní polymery, např. dextran, hyaluronany, pektiny, alginát, celulóza nebo agaróza, jsou biokompatibilní a biodegradovatelné na netoxické produkty. Bývají ale částečně rozpustné, porézní a vykazují neselektivní adsorpci proteinů. Syntetické polymery, např. polystyren (PS), polyethylenglykol (PEG), polymethylmethakrylát (PMMA) nebo polyvinylalkohol (PVA) jsou obvykle výhodnější z hlediska mechanických i fyzikálních vlastností, ale nemusí být vhodné pro biologické aplikace [10][11][12].

1.2.4 Funkcionalizace magnetických nosičů

Fyzikálně-chemické vlastnosti magnetických nosičů lze výrazně ovlivnit navázáním funkčních skupin. Funkční skupiny ovlivňují nejen oblast použití magnetických nano- a mikročástic

(izolace DNA, RNA, proteinů, enzymů, apod.), ale také použitelnost částic ve vodných resp. organických roztocích.

Magnetické nosiče kompatibilní s organickými roztoky obsahují hydrofobní skupiny, například mastné kyseliny nebo alkylfenoly. Naopak částice kompatibilní s vodnými roztoky obsahují hydrofilní skupiny, např. amonné soli, polyoly nebo lysin. Amfipatické nosiče obsahují hydrofilní i hydrofobní funkční skupiny, které způsobují, že nedochází k jejich agregaci ve vodě ani v olejích [13].

1.2.4.1 Funkcionalizace nosičů karboxylovými skupinami

Nosiče funkcionalizované karboxylovými skupinami ($-\text{COOH}$) byly použity k nespecifické adsorpci DNA. Izolace DNA pomocí těchto nosičů se provádí v prostředí poly(etylen glykolu) (PEG 6000) a chloridu sodného (NaCl). Eluce DNA se provádí vodou nebo roztokem o nízké iontové síle [14][15].

Mechanismus adsorpce DNA na povrch nosičů pokrytých karboxylovými skupinami je velmi komplexní a nebyl dosud zcela objasněn [10].

1.2.4.2 Funkcionalizace nosičů hydroxylovými skupinami

Nosiče funkcionalizované hydroxylovými skupinami ($-\text{OH}$), zejména nosiče na bázi silikagelu, neselektivně adsorbují DNA v prostředí o vysoké koncentraci solí nebo chaotropních látek. Eluce DNA se provádí vodou nebo roztokem o nízké iontové síle.

Roztoky o vysoké iontové síle podporují adsorpci DNA na nosič, protože redukují negativní potenciál silikagelu a snižují elektrostatický odpor mezi negativně nabitou molekulou DNA a povrchem nosiče. Současně dochází ke změně konformace DNA v důsledku zvýšení entropie a významné dehydrataci DNA i povrchu silikagelu. V místě kontaktu DNA s povrchem nosiče dochází ke vzniku vodíkových vazeb [16][17].

1.2.4.3 Funkcionalizace nosičů skupinou $-\text{NH}_2$

Aminoskupinami se obvykle funkcionizují částice pokryté polymerní maticí s volnými karboxylovými [18][19] nebo hydroxylovými skupinami [20], případně částice s polystyrenovou maticí [21]. Nosiče funkcionalizované skupinou $-\text{NH}_2$ vážou DNA neselektivně prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi aminoskupinou a fosfátovými skupinami DNA [20].

Adsorpce na povrch nosičů probíhá v prostředí s vysokou iontovou silou, eluce DNA probíhá v prostředí s 0,7M NaCl [20].

1.2.4.4 Funkcionalizace nosičů oligonukleotidy

Nosiče funkcionalizované oligonukleotidy lze využít k izolaci specifické DNA pomocí DNA/DNA hybridizace, resp. k izolaci mRNA pomocí oligo(dT)/mRNA hybridizace [22].

Adsorpce na povrch nosičů probíhá v prostředí se solným roztokem citrátu sodného [23][24].

1.2.5 Imobilizace biologicky aktivních látek na funkční skupiny magnetických nosičů

Spojením magnetických nosičů s biologicky aktivní látkou je možné dosáhnout ideálních vlastností vhodných pro použití v biochemii, molekulární biologii, biotechnologii či nanomedicině. Mezi unikátní vlastnosti magnetických částic patří zejména jejich vysoký specifický povrch, který umožní navázat velká množství ligandů [25].

Vhodně funkcionizované magnetické částice mohou sloužit jako nosiče biologicky aktivních sloučenin, např. enzymů, oligonukleotidů, proteinů i peptidů, protilátek, léčiv, hormonů či diagnostických látek [25].

Imobilizaci látek lze provést celou řadou způsobů. Např. k reverzní imobilizaci biologicky významných proteinů se někdy používá metoda fyzikální sorpce, která je jednoduchá a

levná, ale méně spolehlivá a ve srovnání s kovalentními vazbami málo stabilní [25]. Kovalentní imobilizace je nejčastější imobilizační technikou. Vyžaduje, aby nosič obsahoval funkční skupiny (nejčastěji $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ nebo $-\text{CONH}_2$), které se musí před navázáním aktivních molekul aktivovat. Karboxylové skupiny se aktivují karbodiimidy (např. hydrochloridem 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimidu), aminoskupiny bifunkčními činidly (např. glutaraldehydem, který je rozpustný ve vodě, šetrný k proteinům a lze jej využít i pro zesílení biomolekul) [25].

Velmi užitečnou technikou pro imobilizaci látek je využití částic s imobilizovaným streptavidinem nebo avidinem, které vykazují vysokou afinitu k biotinu [25]. Avidin je tetramerní bílkovina se čtyřmi podjednotkami, z nichž každá obsahuje vazebné místo pro biotin. Také streptavidin je tetramer, oproti avidinu ale vykazuje nižší nespecifické interakce, a proto se používá častěji. Biomolekuly jsou před imobilizací avidinem nebo streptavidinem nejprve biotinylovány, a poté navázány na magnetické nosiče pomocí vazby avidin-biotin resp. streptavidin-biotin. Oba komplexy jsou velmi stabilní, odolávají vysokým teplotám, pH i silným denaturačním činidlům [22][26].

Magnetické částice s imobilizovanými protilátkami se využívají při imunomagnetické separaci (IMS), kterou lze kombinovat s PCR (IMS-PCR) [27]. Protože lze imobilizované protilátky využít k přímému stanovení antigenů, využívá se IMS při separaci buněk patogenních mikroorganismů z potravin a klinických vzorků [28].

1.2.6 Adsorpce a eluce DNA z povrchu magnetických nosičů

Adsorpce DNA na povrch nosičů vyžaduje kondenzaci molekuly DNA, resp. přechod DNA do kulovitě-spirálového tvaru. Kondenzace DNA nastává v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG) a chloridu sodného [29].

Přítomnost PEG v roztoku DNA je považována za termodynamicky nevýhodnou, rozpustnost DNA v roztoku klesá a zvyšují se přitažlivé síly v molekule DNA [29]. DNA přechází do kompaktního, relativně hustého stavu. Kondenzace makromolekul a vztah kritické koncentrace a stupně polymerizace PEG i kritické koncentrace NaCl v roztoku byl studován v celé řadě publikací [17][29][30][31]. Bylo zjištěno, že kritická koncentrace PEG v roztoku klesá se stupněm polymerizace PEG a koncentrací NaCl [29].

Změna podmínek vede k opětovnému zvýšení rozpustnosti DNA, uvolnění elektrostatických vazeb mezi molekulou DNA a povrchem nosičů a návratu k původnímu stavu DNA.

1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin

Spektrofotometrické měření absorbance představuje jednu z nejjednodušších metod pro stanovení koncentrace a čistoty DNA resp. RNA. Nukleové kyseliny absorbují elektromagnetické záření v UV spektru díky heterocyklům v purinových a pyrimidinových bazích. K absorpčnímu maximu dochází při vlnové délce přibližně 260nm (přesná vlnová délka závisí na pH roztoku) [32].

Naměřené hodnoty absorbance se přepočítávají na koncentraci pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1-1)$$

Absorbance roztoku DNA (A) je určena součinem koncentrace (c), délky optické dráhy (l) a molárního absorpčního koeficientu látky (ε). Molární absorpční koeficient je možné vypočítat ze známé délky a sekvence řetězce DNA resp. RNA a pH roztoku. Stanovit

koeficient je možné také experimentálně. Nejčastěji se však používá aproximace hodnoty, protože není známa délka ani sekvence nukleové kyseliny [32].

1.3.1 *Hodnocení čistoty vzorku*

Největší nevýhodou spektrofotometrického stanovení koncentrace nukleových kyselin je nespecifičnost. Každý kontaminant, který absorbuje při 260nm, zvyšuje hodnotu vypočtené koncentrace. Nejběžnější kontaminanty při měření koncentrace DNA zahrnují RNA, proteiny, EDTA a fenol. K absorpčnímu maximu proteinů dochází při vlnové délce 280nm, ovšem proteiny absorbují silně také při 260nm, absorpční maximum fenolu nastává při vlnové délce 264nm, ovšem fenol silně absorbuje také při 260 a 280nm. Absorpční maximum EDTA, Tris a dalších pufrů nastává při vlnové délce přibližně 230nm [32][33].

K hodnocení čistoty vzorku DNA lze využít poměr A_{260nm}/A_{280nm} . Poměr absorbancí čisté DNA bývá 1,86, hodnoty nižší než 1,8 značí kontaminaci proteiny, hodnoty vyšší než 2,0 značí kontaminaci RNA (charakteristický poměr absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} je pro RNA 2,0 a pro čisté proteiny 0,6) [32].

K hodnocení čistoty vzorku RNA lze využít poměr A_{260nm}/A_{230nm} . Poměr absorbancí by měl být vyšší než 2,0. Nižší hodnoty značí kontaminaci guanidinium thiokyanátem, který se často využívá k purifikaci RNA [33].

1.3.2 *Spektrofotometrické měření na přístroji NanoPhotometer™*

NanoPhotometer™ využívá mírně pozměněný Lambert-Beerův zákon:

$$c = (A_{260} - A_{320}) \cdot f_{NA} \cdot f_{LID} \quad (1-2)$$

kde c je koncentrace nukleové kyseliny, A_{260} je absorbance při vlnové délce 260nm, A_{320} je absorbance při vlnové délce 320nm (korekce pozadí), f_{NA} je specifický faktor nukleové kyseliny (50 pro dsDNA, 37 pro ssDNA, 40 pro RNA, 33 pro oligonukleotidy) a f_{LID} je faktor ředění (závisí na použitém víčku).

Kromě absorbancí při vlnové délce 260 a 280nm se tedy měří i absorbance při vlnové délce 320nm. Tato hodnota slouží ke korekci šumu na pozadí [33].

1.4 *Agarózová gelová elektroforéza*

Agarózová gelová elektroforéza je separační metoda založená na skutečnosti, že náboj DNA v neutrálním roztoku je negativní. DNA se tedy v elektrickém poli pohybuje od katody k anodě. Rychlost migrace je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná logaritmu délky řetězce. Krátké řetězce tedy gelem migrují rychleji než dlouhé řetězce. Při dělení se kromě elektrostatických sil uplatňuje i síťový efekt, proto se rozdělí i fragmenty se stejným efektivním nábojem, ale rozdílnou délkou resp. molekulovou hmotností. Rozdělené fragmenty se vizualizují barvivy, která se vážou na molekulu DNA (např. ethidium bromidem) [34].

Hlavními výhodami gelové elektroforézy jsou jednoduchost a reprodukovatelnost. Metoda je použitelná pro fragmenty délky nejvýše 40kb, maximální délka fragmentu ovšem závisí na koncentraci gelu a gradientu elektrického pole [34].

2 Bakterie v mlékárenství a potravinářském průmyslu

2.1 Bakterie v mlékařském průmyslu

V mlékařském průmyslu se bakterie využívají při výrobě jogurtů, kefírů, smetany, kysaných mlék, ale také zrajících sýrů, tvarohů či másla z kysané smetany.

Fermentací nezískávají mléčné výrobky jen delší trvanlivost, ale zejména zvýšenou nutriční hodnotu a specifické sensorické i dietetické vlastnosti. Při procesu fermentace dochází k přeměně mléčné laktózy na kyselinu mléčnou, v závislosti na použitých mikroorganismech vznikají karbonylové sloučeniny, aminokyseliny, těkavé mastné kyseliny, některé vitamíny i antimikrobiální metabolity (bakteriociny, kyselina benzoová, apod.) [35].

Při výrobě mléčných výrobků se využívá tzv. zákysových kultur. Ty se skládají z mezofilních a termofilních bakteriálních kultur [35].

2.1.1 Mezofilní bakteriální kultury

Do skupiny mezofilních bakteriálních kultur patří rody *Lactococcus* a *Leuconostoc*. V zákysových kulturách obvykle převažují druhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, kteří jsou hlavními producenty kyseliny mléčné [35].

Aromatvorné (resp. citrát využívající) druhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* a *Leuconostoc mesenteroides* rozkládají citrát v mléce na oxid uhličitý a směs čtyřuhlíkatých sloučenin, z nichž nejdůležitější je biacetyl, který je nositelem typického aroma. Aromatvorné bakterie se využívají v případě, kdy je žádoucí produkce plynu a aromatických látek (např. výroba zakysaných mlék, másel ze zakysané smetany či sýry s oky) [35].

2.1.2 Termofilní bakteriální kultury

Termofilní bakteriální kultury jsou obvykle tvořeny rody *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Pro výrobu sýrů se nejvíce využívají druhy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus*. Výroby jogurtů se účastní druhy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* [35].

2.2 Bakterie v masném průmyslu

Fermentace je tradiční metodou zpracování masných výrobků. Používá se pro zvýšení trvanlivosti a zisku žádoucích sensorických a chuťových vlastností [36].

K fermentaci masa se používají bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Lactobacillus* (*L. sakei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* nebo *L. pentosus*) a *Pediococcus* (*P. acidilactici* a *P. pentosaceus*), a rody *Staphylococcus* (*S. carnosus*, *S. sylosus*) a *Micrococcus*, které jsou zodpovědné za barvu a chuť výrobku [36][37][38].

2.2.1 Bakterie mléčného kvašení v masném průmyslu

Bakterie mléčného kvašení se výrazněji nepodílí na změně aroma, ale produkcí kyseliny mléčné nepřímo ovlivňují chuť masného výrobku. Nakyslá příchut' se obvykle zakrývá kořením, případně přídavkem sladidel. Produkce kyseliny mléčné je ale velmi důležitá, protože významně přispívá k prodloužení trvanlivosti masa a zamezuje růstu nežádoucích mikroorganismů [38].

Ne všechny bakterie mléčného kvašení jsou v procesu zpracování masa žádoucí. Např. *L. viridescens* může způsobovat zelenání masa, protože produkuje peroxid vodíku, *L. brevis* a *Leuconostoc mesenteroides* mohou způsobit produkci plynů a vznik trpkokyselé chuti masa [38].

2.2.2 Bakterie zodpovědné za chuť a barvu masných výrobků

Bakterie patřící do této skupiny se přímo neúčastní procesu fermentace, ale přesto jsou nepostradatelné při fermentaci masa. Bakterie rodu *Staphylococcus* a *Micrococcus* redukuje dusičnany na dusitany, produkují enzym katalázu, který zamezuje oxidaci masa, a současně produkují velmi důležité aromatické a chuťové složky masných výrobků [38].

2.3 Probiotika

První použili termín *probiotikum* Lilly a Stillwell v roce 1965. Termín pochází z řečtiny a v překladu znamená „pro život“. Lilly a Stillwell definovali probiotika jako mikroorganismy, které jsou prospěšné zdraví, jsou-li konzumovány v potravě nebo doplňcích stravy v dostatečném množství [39][40][41].

Ačkoliv obecné pojetí považuje probiotika za striktně živé mikroorganismy, bylo prokázáno, že k dosažení požadovaného pozitivního efektu na zdraví člověka často stačí i mrtvé buňky nebo dokonce jen části buněk [41]. Ve všech zmiňovaných případech bývají probiotika nejčastěji přijímána jako součást fermentovaných mléčných výrobků nebo doplňků stravy.

2.3.1 Probiotika ve fermentovaných mléčných výrobcích

Lidský organismus se s probiotiky setkává nejčastěji v podobě fermentovaných mléčných výrobků (viz 2.1) nebo výrobků ze sóje. Přitom nejdůležitější pro zdraví člověka jsou kysané mléčné výrobky¹, které zůstávají po kysacím procesu tepelně neošetřené, a tak obsahují životaschopné bakterie. Výhodou fermentovaných mléčných výrobků je, že kromě samotných probiotik obsahují také látky, které jsou potřebné k výživě probiotických bakterií (prebiotika) [42].

2.3.2 Probiotika jako doplňky stravy

Doplňky stravy definuje zákon č. 456/2004 Sb. a směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2002/46/ES jako potraviny, které jsou určeny k přímé spotřebě, ale odlišují se od potravin pro běžnou spotřebu vysokým obsahem vitaminů, minerálů nebo jiných látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, které byly vyrobeny za účelem doplnění běžné stravy spotřebitele tak, aby došlo ke zlepšení úrovně jeho zdraví. Doplnky stravy tedy nelze zaměňovat s léčivými nebo léčivými přípravky.

Ačkoliv mohou mít doplňky stravy příznivý účinek na lidské zdraví, zdravotní problémy přímo neléčí. S tím souvisí také způsob schvalování doplňků stravy. Zatímco léčiva musí před schválením Státním ústavem pro kontrolu léčiv projít rozsáhlými klinickými studiemi, ve kterých se posuzují nejen indikace a kontraindikace, ale také dávkování a způsob užití přípravku, doplňky stravy schvalováním neprocházejí. Pokud doplněk stravy obsahuje jen látky schválené příslušnou vyhláškou (446/2004 Sb.), je před uvedením na trh výrobce, dovozce nebo prodejce doplňků stravy pouze povinen zaslat Ministerstvu zdravotnictví ČR českou etiketu výrobku. Pokud doplněk stravy obsahuje látky, které nejsou povolené, vyžádá si Ministerstvo zdravotnictví ČR posudek Státního zdravotního ústavu (SZÚ). SZÚ ovšem zkoumá pouze bezpečnost dané látky, nikoliv její účinnost [43].

Kvalitu doplňků stravy nicméně zkoumá Státní zemědělská a potravinářská inspekce, což je důležité i v případě probiotik.

¹ Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb. se kysaným mléčným výrobkem rozumí mléčný výrobek vyrobený kysáním mléka, smetany nebo podmásli nebo jejich směsi za použití mikroorganismů mléčného kvašení, který není po kysacím procesu tepelně ošetřený.

2.3.3 Výběr mikroorganismů s probiotickými účinky

Jak bylo uvedeno, literatura definuje probiotika jako „živé mikroorganismy převážně lidského původu, jejichž aplikace v přiměřeném množství příznivě ovlivňuje zdraví člověka“ [44]. Přitom jsou známa také kritéria, která má splňovat mikroorganismus, abychom jej mohli označit za probiotický. Zejména se jedná o lidský původ, absenci virulence, detailní identifikaci a typizaci, čistotu preparátu, resistenci vůči kyselému prostředí žaludečních šťáv a žluče nebo schopnost kolonizovat trávicí trakt [45].

2.3.4 Rody probiotických mikroorganismů

Nejčastěji používané probiotické kmeny můžeme rozdělit do 4 skupin:

- laktobacily (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* *bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*)
- bifidobakterie (*B. bifidum*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. longum*)
- nepatogenní *Eschericia coli* (např. kmen *E. coli* Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1)
- jiné (laktokoky, enterokoky, streptokoky nebo kvasinka *Saccharomyces boulardii*). *Saccharomyces boulardii* nesplňuje kritérium probiotika, protože není lidského původu. Mluvíme o něm tedy jako o *nepravém probiotiku* [45].

2.3.5 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní nesporulující koky nebo tyčinky s obsahem G + C nižším než 50%. Jsou to fakultativně anaerobní či mikroaerofilní bakterie, které nevykazují katalázovou aktivitu, a pro růst vyžadují fermentovatelný cukr. Hlavním produktem metabolismu bakterií rodu *Lactobacillus* je kyselina mléčná.

Rod *Lactobacillus* patří fylogeneticky do kmene *Firmicutes*, čeledi *Lactobacillaceae* a řádu *Lactobacillales* [46].

I když je známo více než 120 druhů bakterií rodu *Lactobacillus*, lze za probiotické považovat pouze některé. Ačkoliv jsou laktobacily obecně považovány za bezpečné, druh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nesmí být podáván novorozencům, protože produkuje D-laktát, který novorozenci neumí metabolizovat, a stává se pro ně toxický [47].

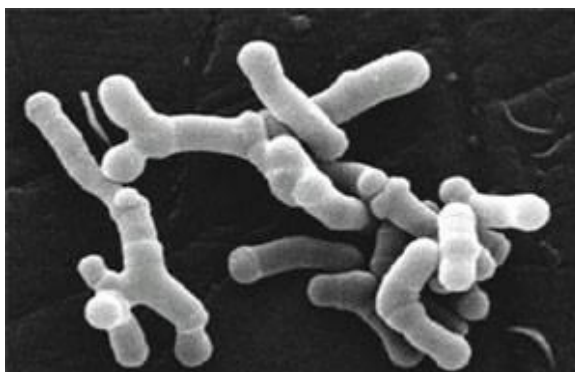


Obrázek 2-1 *Lactobacillus brevis* ATCC 367 [65]

2.3.6 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* fermentující grampozitivní anaerobní bakterie, které využívají celou řadu oligosacharidů a sacharidů. Produkují kyselinu mléčnou a octovou.

Rod *Bifidobacterium* patří do kmene *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteriaceae*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [48].



Obrázek 2-2 *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* ATCC 15697 [66]

Bifidobakterie zahrnují 38 druhů bakterií, ovšem jako probiotikum se používá pouze 6 druhů: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. lactis*, *B. infantis* a *B. animalis*.

Rod *Bifidobacterium* zmírňuje příznaky infekčních průjmů, stimuluje imunitní systém a chrání před karcinogenními látkami [47].

2.3.7 Nepatogenní *Escherichia coli*

Ačkoliv jsou v současnosti probiotika vyráběna především z grampozitivních bakteriálních kmenů, u počátku probiotických farmaceutik stál kmen *E. coli* Nissle 1917. Tento kmen byl původně izolován ze stolice vojáka, který jako jediný netrpěl průjmy v infekcemi zamořené Dobrudži za 1. světové války. Preparát Mutaflor připravený v roce 1917 se stal nejprve terapeutikem pro léčbu průjemových onemocnění, později také dysbakterióz a střevních zánětů. *E. coli* Nissle 1917 prospívá také při zácpě [45].

Hlavní výhodou *E. coli* Nissle 1917 je celková molekulárně-genetická typizace kmene, navíc *E. coli* Nissle 1917 neobsahuje žádné plazmidy, přenosné geny ani geny bakteriální rezistence, nevytváří enterotoxiny ani cytotoxiny a je tedy velmi bezpečný. Jediným nežádoucím účinkem může být nadýmání po nadměrném užívání terapeutika [2][49].

2.3.8 Ostatní probiotické kmeny

Do této skupiny patří např. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Významná je také kvasinka *Saccharomyces boulardi*, která inhibuje růst patogenů včetně *Clostridium difficile*, dále redukuje průnik sodíku a vody do střevního lumina, indukuje exkreci IgA ve sliznici trávicího traktu a zvyšuje aktivitu enzymů pro štěpení disacharidů včetně laktózy a maltózy [2].

3 Identifikace bakterií

Identifikací bakterií se rozumí porovnání určované bakterie se známou bakterií, obvykle se sbírkovým nebo typovým kmenem. Jedná se o proces, při kterém se zjišťuje, ke kterému známému taxonu (druhu) lze izolát přiřadit. Při analýze většího počtu izolátů se kromě zařazení do druhu studuje i jejich příbuznost.

3.1 Kultivační (klasické) metody

Klasické metody identifikace bakterií jsou založeny na studiu fenotypových vlastností. Mezi základní hodnocené charakteristiky patří:

1. **Morfologie buněk.** Hodnotí se tvar (koky, bacily, vibria, spiruly), řetězení (tvorba hroznů, řetízků nebo vláken), přítomnost a počet bičíků (monotricha, bitricha, lofotricha, amfitricha, peritricha), velikost (obvykle průměr 0,5–1,0 μm a délka 2–10 μm) a struktura buněk (kapsule, struktura buněčné stěny) [50].
2. **Barvení.** Používá se barvení podle Grama, Ziehl-Neelsenova metoda barvení acidorezistentních bakterií, negativní barvení, apod. [50][51]
3. **Kultivační vlastnosti.** Hodnotí se tvar, okraje, růst, elevace, morfologie a pigmentace kolonií na pevném kultivačním médiu a růst v tekutém kultivačním médiu [50][52]. Dále se měří růst v závislosti na teplotě (rozdělení na psychofilní, mezofilní, termofilní a psychrotrofní bakterie), zjišťuje se vztah ke kyslíku (aerobní, anaerobní, fakultativně aerobní, mikroaerofilní bakterie), ověřuje citlivost na antibiotika, atd. [51]
4. **Fermentace cukru/glukózy.** Měří se intenzita fermentace, která koreluje se změnou pH, a produkce plynů [50].
5. **Aktivita enzymů a další biochemické testy.** Testuje se produkce enzymů katalázy, oxidázy, koagulázy, ureázy a fosfatázy [50][52]. Dále se ověřuje hydrolyza želatiny, kaseinu, škrobu či lecitinu, produkce indolu z tryptofanu, amoniaku z peptonu, argininu nebo moči, redukce nitrátů, deaminace fenylalaninu nebo utilizace citrátu jako zdroje uhlíku apod. [51]
6. **Sérologická aktivita.** Využívá se skutečnosti, že bakterie mohou sloužit jako antigen. Gram-pozitivní bakterie jsou obvykle mnohem slabšími antigeny v porovnání s Gram-negativními bakteriemi [50].
7. **Test citlivosti k bakteriofágům.** Test citlivosti k bakteriofágům je založen na skutečnosti, že bakteriální viry (fágy) infikují pouze určitý druh bakterií. V buněčné kultuře, která byla infikována bakteriofágy, dochází k usmrcení bakterií (lyzi) a vzniku plaků [50].

3.2 Nekultivační metody

Klasické kultivační metody se potýkají s významnými nevýhodami. Jsou složité, časově náročné a ne vždy plně spolehlivé. Kultivovat lze pouze 1 % mikroorganismů přítomných v prostředí [53]. Krom toho lze fyziologické a jiné vlastnosti mikroorganismů ovlivnit podmínkami kultivace [54]. Proto se k detekci, identifikaci a kvantifikaci bakterií používají stále častěji nekultivační, molekulárně-biologické metody.

Molekulárně-biologické metody lze rozdělit do 3 skupin podle typu makromolekul používaných k analýze:

- Polysacharidy a lipidy
- Proteiny buněčné stěny a cytoplasmatické membrány

- Nukleové kyseliny (DNA a RNA)

Vzhledem k tomu, že je diplomová práce zaměřena na studium pevných nosičů při izolaci DNA, bude v dalším textu věnována hlavní pozornost metodám založeným na amplifikaci DNA.

3.2.1 Analýza DNA pomocí PCR

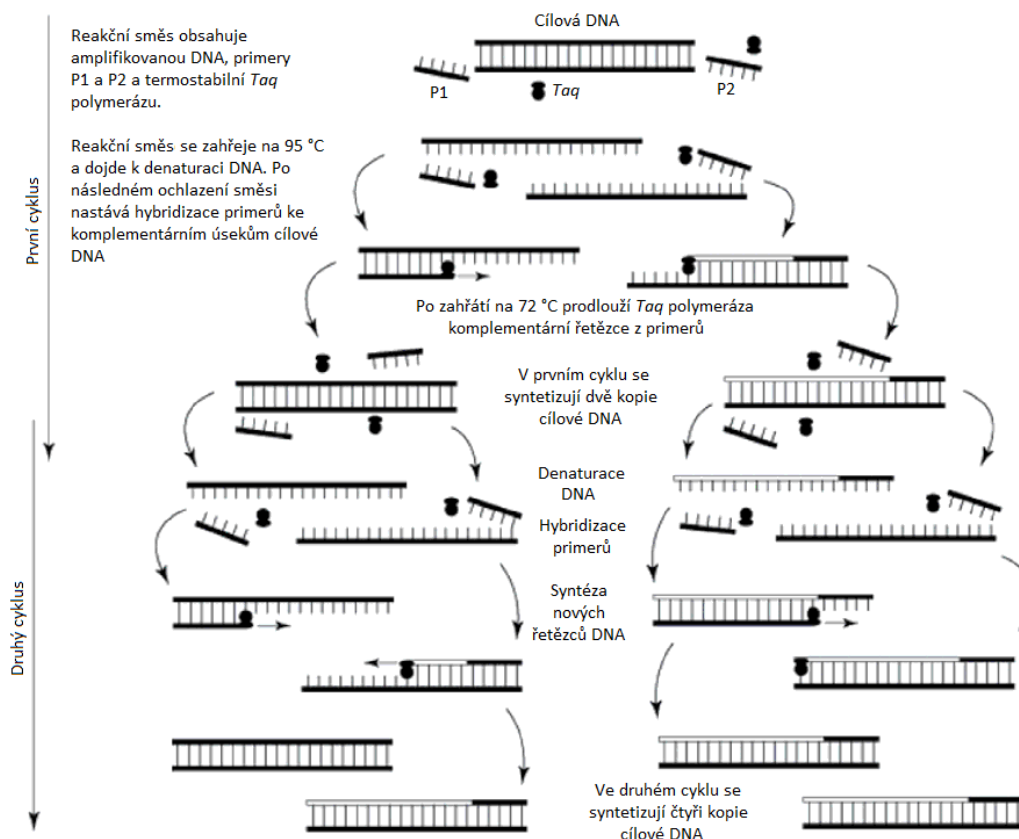
Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) se používá k amplifikaci DNA a ve své době způsobila revoluci v molekulární biologii. Díky rychlosti analýzy a specifitě zažívá v posledních desetiletích velký rozmach také v potravinářském průmyslu, zejména při identifikaci patogenů [55].

Metodu PCR objevil v roce 1983 Kary Mullis [56], který za svůj objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii [57].

PCR je molekulárně-diagnostická metoda založená na cyklicky se opakující syntéze specifického úseku DNA. K vybranému úseku DNA se hybridizují krátké oligonukleotidy, tzv. primery, od nichž začíná syntéza nového řetězce. Syntéza je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus* (proto se označuje jako *Taq* polymeráza) [58].

PCR se provádí v zařízení zvaném thermocycler (cyklátor) a spočívá v periodickém opakování tří po sobě jdoucích kroků:

- denaturace dsDNA; denaturace DNA probíhá při 95 °C,
- připojení primerů; primery jsou hybridizovány při teplotě 50–65 °C (dle jejich nukleotidového složení),
- syntéza DNA; syntéza DNA probíhá při teplotě 68–75 °C.



Obrázek 3-1 Průběh PCR [67 str. 269]

Opakováním všech kroků PCR dochází exponenciální rychlostí k syntéze vybraného úseku DNA. Počet opakování závisí na výchozí koncentraci DNA, ale obvykle se PCR opakuje 25–35krát. Počet cyklů je omezen, protože příliš vysoký počet opakování výrazně snižuje účinnost DNA polymerázy [59].

3.2.1.1 Problémy při PCR

Identifikace čistých kultur pomocí PCR bývá zpravidla bezproblémová. Potíže však mohou nastat při izolaci DNA z komplexních vzorků, např. půdy, stolice, klinických vzorků nebo potravin.

Falešně pozitivní výsledky PCR

Při odběru komplexních vzorků hrozí kontaminace exogenní DNA, která může být příčinou falešně pozitivních výsledků PCR. Kontaminaci lze eliminovat důsledným používáním dekontaminačních procedur (UV záření, chlornan sodný, apod.) a přesným dodržáním pracovních postupů zejména při odběru a skladování vzorku [60].

Falešně negativní výsledky PCR

Opačný problém představují falešně negativní výsledky, které jsou zpravidla způsobeny inhibitory PCR (organické a anorganické chemikálie, detergenty, antibiotika, pufrý, enzymy, polysacharidy, tuky a proteiny). Inhibitory PCR mohou být endogenní či exogenní [60].

Endogenní inhibitory zahrnují zejména kontaminované enzymy, některé typy zkumavek, celulózoové a nitrocelulózoové filtry, apod. [60].

Exogenní inhibici způsobuje zejména nedostatečně vyčištěná DNA s obsahem DNáz a chemikálie používané k izolaci DNA (fenol, chloroform), ale také pyl, prach z rukavic, apod. [60].

CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo porovnat různé typy magnetických mikročastic při izolaci DNA. K izolaci byla použita purifikovaná DNA bakterií rodu *Lactobacillus*. Přítomnost a kvalita DNA byla prokázána pomocí PCR specifické pro rod *Lactobacillus*.

Experimentální část diplomové práce byla rozdělena do těchto kroků:

1. Kultivace buněk
2. Příprava hrubých lyzátů buněk
3. Purifikace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí fenol-chloroformové extrakce
4. Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic
5. Spektrofotometrické stanovení množství DNA
6. Ověření kvality DNA pomocí PCR
7. Ověření afinity magnetických mikročastic k purifikované RNA
8. Spektrofotometrické stanovení množství RNA
9. Aplikace postupu izolace DNA magnetickými nosiči na konkrétní probiotický výrobek

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 Materiál

4.1 Bakteriální buňky

Při experimentech byly použity bakterie rodu *Lactobacillus* z České sbírky mikroorganismů, CCM, Brno, Česká republika. Bakterie rodu *L. sakei* byly získány od prof. Ireny Rogelj, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko:

- *Lactobacillus fermentum* CCM 7192^T
- *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935^T
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T
- *Lactobacillus sakei* IM398

4.2 Purifikovaná RNA

Purifikovaná kvasinková RNA byla získána od doc. RNDr. Aleny Španové, CSc. z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

4.3 Chemikálie

Roztoky byly připravovány ze zásobních roztoků, které byly sterilizovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Ředění roztoků bylo prováděno sterilní destilovanou vodou resp. sterilním TE puforem.

- Agar (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Agaróza pro elektroforézu (Serva Electrophoresis, Německo)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, Brno, ČR)
- DNA velikostní standard (žebříček 100bp) (MALAMITÉ, Moravské Prusy, Česká republika). Obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500bp.
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Ethidium bromid, EtBr (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Chlorid sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Chloroform (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Isoamylalkohol (3-methyl-1-butanol) (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Serva Electrophoresis, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Lysozym (Serva Electrophoresis, Německo)
- MRS Broth (Oxoid Limited, Basingstoke, Velká Británie)

- Octan sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Polyethylenglykol 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, Německo)
- RNáza A (Serva, Heidelberg, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris-báze (Serva Electrophoresis, Německo)
- Další běžné chemikálie z komerční sítě v kvalitě p.a.

4.4 Magnetické mikročástice

- Uniformní superparamagnetické monodisperzní polymerní částice na bázi polystyrenu Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (DynaL, Norsko).
- Magnetické částice na bázi neporézního skla MPG® Uncoated (PureBiotech LLC, New Jersey, USA).
- Magnetické neporézní poly(glycidyl-methakrylátové) částice P(HEMA-co-GMA) funkcionalizované karboxylovými skupinami (-COOH) Fkol 135ox (Ing. Daniel Horák, CSc., Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha, Česká republika).
- Hypersíťované styren (St)-divinylbenzenové (DVB) částice s vysokým specifickým povrchem (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Česká republika)

4.5 Roztoky

4.5.1 Živná média

- Tekuté živné médium MRS

52g média MRS Broth (de Man, Rogosa a Sharp) bylo rozpuštěno v 1000ml destilované vody. pH média bylo upraveno pomocí 1M roztoku NaOH na hodnotu 6,5. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

- Pevné živné médium MRS

Pevné živné médium MRS bylo připraven smícháním tekutého MRS média s 15g agarózy. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.5.2 Roztoky pro přípravu hrubého lyzátu buněk

- 0,5M EDTA

0,5M roztok EDTA byl připraven rozpuštěním 161,8g kyseliny ethylendiamintetraoctové v 800ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno 1M NaOH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1000ml a sterilizován autokláfováním (teplota 121 °C po dobu 20 minut).

- 1M Tris-HCl

1M roztok Tris-HCl byl připraven rozpuštěním 12,1g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 70ml destilované vody. pH bylo koncentrovanou HCl upraveno na hodnotu 7,8. Roztok byl poté doplněn na objem 100ml a sterilizován v autoklávu (teplota 121 °C po dobu 20 minut).

- Roztok A

Roztok A byl připraven smícháním 1ml 1M Tris-HCl (pH 7,8), 1ml EDTA (pH 8,0) a 98ml destilované vody.

- **Roztok B**
Roztok B byl připraven smícháním roztoku A a lysozymu v množství $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- **20% SDS**
20% SDS byl připraven rozpuštěním 20g SDS v 80ml sterilní destilované vody při teplotě $68\text{ }^{\circ}\text{C}$. pH bylo koncentrovanou HCl upraveno na hodnotu 7,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100ml.

4.5.3 Roztoky pro fenol-chloroformovou extrakci DNA

- **TE pufr**
TE pufr byl připraven sterilním smícháním 1ml 1M Tris-HCl (pH 7,8), 200 μl 0,5M EDTA (pH 8,0) a 98ml sterilní destilované vody.
- **Fenol**
Fenol pro extrakci DNA byl připraven z předdestilovaného fenolu, který byl nasycen TE pufr. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,8.
- **CIZ**
Roztok CIZ byl připraven smícháním chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24:1.
- **Octan sodný**
3M octan sodný byl připraven rozpuštěním 408,1g trihydrátu octanu sodného v 800ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000ml a sterilizován autoklávováním při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20minut.

4.5.4 Roztoky pro přípravu RNA o různých koncentracích

- **TE pufr pro RNA**
TE pufr pro RNA byl připraven smícháním 1ml 1M Tris-HCl (pH 7,8), 200 μl 0,5M EDTA (pH 8,0) a 98ml sterilní destilované vody. pH bylo upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,0.

4.5.5 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročastic

- **NaCl**
5M NaCl bylo připraveno rozpuštěním 58,4g NaCl ve 150ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 200ml a sterilizován v autoklávu ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20minut).
- **PEG**
40% PEG byl připraven rozpuštěním 40g polyethylenglykolu 6000 v 60ml sterilní destilované vody a roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100ml.
- **70% Ethanol**
70% ethanol byl připraven smícháním 70ml 96% ethanolu a 26ml sterilní destilované vody.

4.6 Komponenty pro PCR

- PCR voda (voda pro injekce) (Braun, Melsugen, Německo)
- 10 \times PCR Blue Buffer (PCR reakční pufr kompletní, obsahující MgCl_2) (Top-Bio, Praha, Česká republika)

- PCR DTP Mix (10mM) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
- Oligonukleotidové primery LbLMA1-rev, R16-1 (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, Česká republika)
- *Taq* DNA Polymeráza 1.1 (1 U· μ l⁻¹) (Top-Bio, Praha, Česká republika)

4.6.1 **Roztoky a gely pro elektroforézu**

- **TBE pufr**
5× koncentrovaný TBE pufr byl připraven smícháním 54g Tris-HCl, 27,5g H₃BO₃ a 20ml 0,5M EDTA o pH 8,0. Vzniklý roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 1000ml. Roztok se před použitím ředí destilovanou vodou 10×.
- **Nanášecí pufr**
Použity byly pufrы Gel Loading Dey, Blue (New England Biolabs, Ipswich, USA) a Yellow Load (Top-Bio, Praha, Česká republika).
- **Agarózový gel**
1,8% agarózový gel byl připraven rozpuštěním 0,9g agarózy v 50ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru (viz 4.6.1).
- **Ethidium bromid**
Roztok ethidium bromidu o koncentraci 1 μ g·ml⁻¹ byl připraven zředěním 100 μ l ethidium bromidu o koncentraci 5mg·ml⁻¹ v 500ml destilované vody.

4.7 **Přístroje a pomůcky**

- Analytické váhy Pioneer PA 114 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Inkubátor FTC 90I (Velp, Usmate, Itálie)
- Magnetický separátor DynaMag-2 (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, Česká republika)
- Termostat Mini Incubator (Labnet, New Jersey, USA)
- NanoPhotometer® (Implen, Mnichov, Německo)
- PCR box UVC/T-AR (Biosan, Riga, Litva)
- Předvážky CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300V (Labnet, New Jersey, USA)
- Zkumavky typu Eppendorf
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a pomůcky

4.8 **Testované potravinové výrobky**

- **Jogurtové mléko Actimel**
Kultury: *L. casei* DN 114001, jogurtová kultura
Množství mikroorganismů v kulturách: 1·10¹⁰/100g
Složení: mléko, cukr, glukóza, jogurtová kultura, *L. casei* DN 114001, vitamín B6, vitamín D
Výrobce: Danone, a.s., Praha, Česká republika

- **Linex® Forte**

Kultury: *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12

Množství mikroorganismů v kulturách: $1 \cdot 10^9$ /tableta (obě kultury)

Složení: dextrosa, mikrokrytalická celulóza, bramborový škrob, stearan hořečnatý, inulin, oligosacharidy

Výrobce: Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovinsko

5 Metody

5.1 Kultivace bakteriálních buněk

Bakterie rodu *Lactobacillus* (kmeny *Lactobacillus fermentum* CCM 7192^T, *Lactobacillus johnsonii* 2935^T, *Lactobacillus sakei* IM398 a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T) narostlé v tekutém živném médiu MRS byly přeočkovány do 10ml tekutého živného média (inokulace 1–5%) a aerobně kultivovány po dobu 48 hodin v termostatu nastaveném na teplotu 37 °C.

Čistota bakteriální kultury *L. rhamnosus* byla ověřena křížovým roztěrem na Petriho misce s tuhým MRS médiem.

5.2 Spektrofotometrické měření optické hustoty bakteriálních buněk

Optická hustota buněk v médiu byla měřena pomocí přístroje NanoPhotometer® od firmy Implen. Měření probíhalo pomocí běžných kyvet. Pro měření optické hustoty byl použit program OD 600, který měří absorbanci světla o vlnové délce 600nm.

Kalibrace přístroje byla provedena pomocí MRS média 10krát ředěného sterilní vodou. Měření probíhalo při laboratorní teplotě, po vytemperování a dostatečném promíchání vzorků. Všechny vzorky byly 10krát ředěné sterilní vodou.

5.3 Lyze buněk

5.3.1 Příprava hrubého lyzátu buněk z buněčné kultury

Kultura buněk narostlá v tekutém živném médiu MRS (1–4,5ml) byla přenesena do zkumavky typu Eppendorf a vzniklá suspenze se centrifugovala při 14500min⁻¹ po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a sediment se nechal dobře okapat.

Sediment byl následně resuspendován v 1ml roztoku A a suspenze byla znovu centrifugována (14500min⁻¹ po dobu 3 minut). Potom bylo přidáno 500µl roztoku B a sediment byl opět resuspendován. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně bylo přidáno 12,5µl 20% SDS a 5µl proteinázy K o koncentraci 100µg·ml⁻¹ a vzorek se inkuboval v termostatu při 55 °C po dobu 1 hodiny. Poté bylo přidáno 10µl RNázy A o koncentraci 100µg·ml⁻¹ a po promíchání se vzorek inkuboval při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

5.3.2 Příprava hrubého lyzátu buněk z mléčného výrobku

Do zkumavky typu Eppendorf byl přenesen 2krát 1ml dobře promíchaného mléčného výrobku a vzniklá suspenze se centrifugovala při 14500min⁻¹ po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a sediment se nechal dobře okapat.

Sediment byl následně resuspendován v 1ml roztoku A a suspenze byla znovu centrifugována (14500min⁻¹ po dobu 5 minut). Potom byl přidán 1ml roztoku B a sediment byl opět resuspendován. Vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě a následně bylo přidáno 50µl 20% SDS a 5µl proteinázy K o koncentraci 1mg·ml⁻¹ a vzorek se inkuboval v termostatu při 55 °C do druhého dne. Poté bylo přidáno 10µl RNázy A o koncentraci 100µg·ml⁻¹ a po promíchání se vzorek inkuboval při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

5.4 Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů

Smícháním 0,4g agarózy a 50ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru a povařením v mikrovlnné troubě byl připraven 0,8% agarózový gel, který byl nalit do misky s hřebínkem a ponechán 1 hodinu tuhnout.

Do jednotlivých komůrek bylo nanесeno 10µl hrubého lyzátu a 2µl nanášecího (vkládacího) pufru. Byla spuštěna elektroforéza, která se nechala pod napětím 85 V probíhat 1,5 hodiny. Po skončení elektroforézy byl gel po dobu 1 hodiny barven v ethidium bromidu.

5.5 Fenol-chloroformová extrakce DNA

5.5.1 Extrakce fenolem

K 500 μl lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu a směs se kývavým pohybem promíchávala 4 minuty. Následně se suspenze centrifugovala při $14\,500\text{min}^{-1}$ po dobu 3 min.

Pomocí mikropipety byla do čisté zkumavky typu Eppendorf odebrána vodná fáze a následně bylo přidáno 700 μl CIZ směsi. Roztok byl kývavým pohybem promícháván po dobu 4 min a poté znovu centrifugován po dobu 3 minut.

Vodná fáze byla odebrána do čisté zkumavky typu Eppendorf.

5.5.2 Srážení ethanolem

Ke vzorku DNA byla přidána 1/20 objemu 3M octanu sodného a 800 μl 96% ethanolu. Obsah byl promíchán a nechal se vysrážet při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min. Obsah zkumavky typu Eppendorf se centrifugoval po dobu 15 min při $14\,500\text{min}^{-1}$ a následně byl slit jeho supernatant.

Sediment se usušil v exsikátoru a izolovaná DNA se přes noc rozpouštěla v TE pufru.

5.6 Příprava DNA o různé koncentraci

DNA z kuřecích erytrocytů byla rozpuštěna v TE pufru na koncentraci $4\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $2\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $1\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $500\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $250\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $125\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $62,5\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.7 Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic

Do sterilních zkumavek typu Eppendorf byla připravena separační směs ze 400 μl 5M NaCl, 100 μl DNA extrahovaného fenol-chloroformovou extrakcí (viz 5.3.2), 400 μl 40% poly(ethylenglykolu) PEG 6000 a 100 μl magnetických mikročastic (viz 4.4) o koncentraci $2\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Připravená směs byla při laboratorní teplotě inkubována po dobu 15 minut, a potom byly částice s navázanou DNA 15 minut separovány pomocí magnetického separátoru. Ze zkumavek typu Eppendorf stále umístěných v magnetickém separátoru byl následně opatrně odpipetován supernatant.

Po odstranění magnetu byly zkumavky s navázanou DNA 2× promyty 1000 μl 70% ethanolu, DNA ve vzniklé suspenzi separována po dobu 2 minut a následně byl roztok ethanolu opatrně odpipetován.

Sediment se usušil v exsikátoru a izolovaná DNA byla 1 hodinu eluována do 12,5–25 μl TE pufru.

Částice byly separovány v magnetickém separátoru po dobu 2 minut a přečištěná DNA byla přepipetována do čistých zkumavek typu Eppendorf.

5.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace DNA byla stanovena pomocí přístroje NanoPhotometer® od firmy Implen pomocí kyvety LabelGuard™. Pro měření koncentrace byl použit program dsDNA.

Kalibrace přístroje byla provedena pomocí TE pufru. Měření probíhalo při laboratorní teplotě po vytemperování a dostatečném promíchání všech vzorků. Sledované byly hodnoty absorbance při vlnových délkách 230, 260, 280 a 320 nm.

Měření probíhalo s LID faktorem 5, 10 a 50 pro velikosti kapek 6 μl (LID faktor 5), 3 μl (LID faktor 10) a 0,7 μl (LID faktor 50).

5.9 Příprava RNA o různé koncentraci

Kvasinková RNA byla rozpuštěna v TE pufru pro RNA na koncentraci $3\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $2\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $1\,000\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $500\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA byla stanovena pomocí přístroje NanoPhotometer® stejným způsobem jako v případě kapitoly 5.8. Měření koncentrace bylo prováděno v programu RNA.

5.11 PCR s purifikovanou DNA

5.11.1 Příprava směsi pro PCR [61]

Všechny komponenty PCR reakce byly před provedením PCR promíchány a krátce centrifugovány.

Komponenty PCR reakce byly smíchány v tomto pořadí:

1. Voda pro PCR (17,5 µl)
2. 10× reakční pufr (2,5 µl)
3. 10mM směs dNTP (1 µl)
4. Primer LbLMA1 (1 µl)
5. Primer R16-1 (1 µl)
6. *Taq* DNA polymeráza (1 µl)
7. DNA matrice (1 µl)

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088^T (CCM, Brno, ČR) (10ng·µl⁻¹), jako negativní kontrola byla namísto DNA matrice použita voda pro PCR.

5.11.2 Provedení PCR

Zkumavky se složkami směsi pro PCR byly promíchány, krátce stočeny a umístěny do thermocycleru. Thermocycler byl naprogramován na PCR bakterií rodu *Lactobacillus* s využitím rodově specifických primerů (LbLMA1-rev a R16-1) [61]:

1. Denaturace DNA (95 °C/30s)
2. Připojení primerů (55 °C/30s)
3. Syntéza DNA (72 °C/60s)

První denaturace byla prodloužena na 5minut, poslední syntéza potom prodloužena na 10minut.

Cyklus byl opakován 30×.

Specifický produkt PCR o velikosti 250bp je detekován pomocí agarózové gelové elektroforézy.

5.12 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

Smícháním 0,9g agarózy a 50ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru a povařením v mikrovlnné troubě byl připraven 1,8% agarózový gel, který byl nalit do misky s hřebínkem a ponechán 1 hodinu tuhnout.

Do jednotlivých komůrek bylo nanášeno 25µl produktu PCR a 5µl nanášecího (vkládacího) pufru, do dalších dvou komůrek byla nanášena pozitivní a negativní kontrola a do poslední komůrky bylo nanášeno 5µl velikostního standardu.

Byla spuštěna elektroforéza, která se nechala pod napětím 90 V probíhat 1,5 hodiny. Po skončení elektroforézy byl gel po dobu 1 hodiny barven v ethidium bromidu.

VÝSLEDKY

6 Výběr a kultivace bakteriálních kmenů

Cílem bylo izolovat DNA v co největší koncentraci. Testován byl růst 4 bakteriálních kmenů a množství izolované DNA pro jednotlivé kmeny.

6.1 Kultivace bakteriálních buněk

Bakterie kmenů *L. fermentum* CCM 7192^T, *L. johnsonii* CCM 2935^T, *L. rhamnosus* CCM 1825^T a *L. sakei* IM398 byly kultivovány v tekutém živném médiu při 37 °C po dobu 48 hodin podle postupu uvedeném v kapitole 5.1. Bakterie narostly do různého zákalu.

Optická hustota ($A_{600\text{nm}}$) bakterií kmene *L. fermentum* CCM 7192^T byla 0,605, bakterie kmene *L. johnsonii* CCM 2935^T narostly do optické hustoty 0,628, médium s bakteriální kulturou kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T mělo optickou hustotu 0,905 a bakterie kmene *L. sakei* IM398 narostly do optické hustoty 0,854.

⇒ Největší zákal byl naměřen u bakteriální kultury kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T (0,905).

6.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury *L. rhamnosus* CCM 1825^T

Čistota bakteriální kultury byla ověřena křížovým roztěrem na pevné MRS médium. Výsledek křížového roztěru kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T je uveden na obrázku 6-1. Narostlé kolonie byly bílé a vypouklé, pravidelného tvaru o přibližně stejné velikosti, bez známek kontaminace.



Obrázek 6-1 Růst buněk *L. rhamnosus* CCM 1825^T na tuhém MRS médiu po křížovém roztěru

⇒ Bakteriální kultura byla čistá, vhodná pro izolaci DNA.

6.3 Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

Zkumavky s kulturou bakterií druhu *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* a *L. sakei* byly promíchány a z každé byl odebrán 1 ml kultury, ze které byl připraven hrubý lyzát podle postupu uvedeného v kapitole 5.3. Poté byla provedena fenol-chloroformová extrakce podle kapitoly 5.5. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 200 μ l TE pufru.

⇒ Ze všech kmenů byla izolována DNA.

6.4 Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty DNA

Vzorky DNA separované pomocí fenol-chloroformové extrakce byly podrobeny spektrofotometrickému stanovení čistoty a koncentrace DNA (viz tabulka 6-1). Měřena byla absorbance při vlnové délce 230, 260, 280 a 320 nm a poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$.

Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 μ l.

Požadavky na čistotu (poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) splňovaly všechny vzorky. Nejvyšší koncentraci DNA měl vzorek DNA izolovaný z bakterií kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T.

Tabulka 6-1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty analyzovaných kmenů

Kmen	c [ng· μ l ⁻¹]	Absorbance [-]				$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ [-]	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ [-]	m [μ g]
		$A_{230\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{320\text{nm}}$			
<i>L. fermentum</i> CCM 7192 ^T	149,0	0,15	0,30	0,16	0,00	1,86	2,01	29,8
<i>L. johnsonii</i> CCM 2935 ^T	160,0	0,16	0,32	0,17	0,00	1,91	2,09	32,0
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	559,0	0,52	1,12	0,57	0,01	1,99	2,17	111,8
<i>L. sakei</i> IM398	266,0	0,29	0,54	0,27	0,00	2,02	1,84	53,2

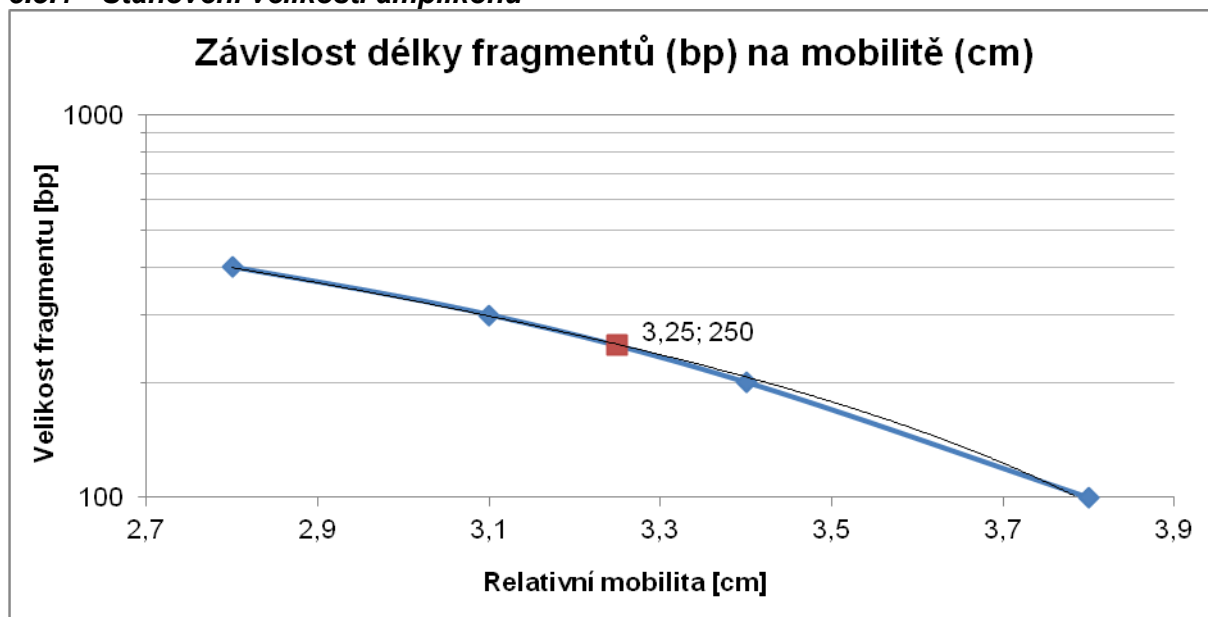
c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA

⇒ Největší množství DNA bylo izolováno z kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T (111,8 mg).

6.5 Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

DNA bakteriálních kmenů *L. fermentum* CCM 7192^T, *L. johnsonii* CCM 2935^T, *L. rhamnosus* CCM 1825^T a *L. sakei* IM398 izolovaná pomocí fenol-chloroformové extrakce byla naředěna na koncentraci 10 ng· μ l⁻¹ a amplifikována pomocí PCR s primery LbLMA1-rev a R16-1 podle postupu uvedeného v kapitole 5.11.

6.5.1 Stanovení velikosti amplikonů

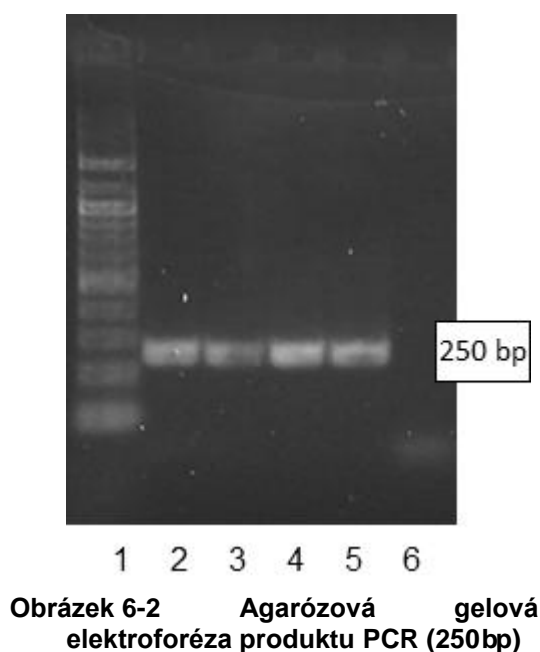


Graf 6-1 Závislost délky fragmentů (bp) na mobilitě (cm)

⇒ Amplikony měly velikost 250bp.

6.5.2 Detekce produktů PCR pomocí agaróзовé gelové elektroforézy

Pomocí agaróзовé gelové elektroforézy byla provedena detekce produktů PCR (viz obrázek 6-2). Vyhodnocení intenzity produktů PCR je uvedeno v tabulce 6-2. Všechny produkty PCR měly stejnou délku fragmentu jako pozitivní kontrola.



Tabulka 6-2 Vyhodnocení průběhu PCR

Běh	Popis	Detekce produktu PCR
1	Žebříček 100bp	-
2	<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	+
3	<i>L. fermentum</i> CCM 7192 ^T	+
4	<i>L. sakei</i> IM398	+
5	<i>L. johnsonii</i> CCM 2935 ^T	+
6	Negativní kontrola	-

- produkt PCR nebyl detekován

+ produkt PCR byl detekován

⇒ DNA se amplifikuje v PCR za vzniku specifických produktů.

7 Testování magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace

Efektivita a účinnost různých druhů magnetických mikročastic byla porovnávána pomocí DNA kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T. Porovnávány byly částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol 135ox a hypersíťované částice (viz kapitola 4.4).

7.1 Příprava hrubých lyzátů buněk

Kultivace bakteriálních buněk kultury *L. rhamnosus* CCM 1825^T probíhala 48 hodin podle postupu uvedeného v kapitole 5.1. Optická hustota nárůstu buněk je uvedena v tabulce 7-1.

Tabulka 7-1 Optická hustota nárůstu buněk

Zkumavka	A_{600nm} [-]			
	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr
1	0,795	0,805	0,804	0,80
2	0,690	0,669	0,681	0,68
3	0,689	0,705	0,712	0,70

⇒ Buňky narostly do optické hustoty 0,68–0,80.

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 3 × 1,5 ml buněčné kultury podle kapitoly 5.3.1. Hrubý lyzát HL1.1 a HL1.2 byl připraven z kultury narostlé ve zkumavce 1, hrubý lyzát HL2.1 a HL2.2 byl připraven ze zkumavky 2 a hrubý lyzát HL3.1 a HL3.2 byl připraven ze zkumavky 3.

7.1.1 Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk

Část hrubých lyzátů vzorků HL1.1, HL2.1 a HL3.1 byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu. Výsledek agarózové gelové elektroforézy hrubých lyzátů buněk je uveden na obrázku 7-1. Popis obrázku viz tabulka 7-2.



Obrázek 7-1 Agarózová gelová elektroforéza hrubého lyzátu buněk (HL1.1, HL2.1 a HL3.1)

Tabulka 7-2 Vyhodnocení průběhu agarózové gelové elektroforézy hrubého lyzátu buněk (HL1.1, HL2.1 a HL3.1)

Běh	Hrubý lyzát
1	HL1.1
2	HL2.1
3	HL3.1

⇒ DNA byla na gelu přítomna.

7.2 Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

Hrubé lyzáty buněk kultury *L. rhamnosus* CCM 1825^T byly použity pro fenol-chloroformovou extrakci DNA (viz kapitola 5.5). Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 75 µl TE pufru.

Izolovaná DNA byla podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 50, množství nanášené DNA bylo 0,7 µl. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7-3.

Tabulka 7-3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty

Vz.	Zk.	HL	c [ng·µl ⁻¹]	Absorbance [-]				A_{260nm}/A_{280nm} [-]	A_{260nm}/A_{230nm} [-]	m [µg]
				A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{320nm}			
FE1.1	1	HL1.1	923	0,16	0,37	0,18	0,00	2,06	2,31	69,2
FE1.2		HL1.2	1 068	0,21	0,43	0,22	0,00	1,91	2,07	80,1
FE2.1	2	HL2.1	1 043	0,19	0,42	0,21	0,00	1,96	2,15	78,2
FE2.2		HL2.2	888	0,17	0,36	0,20	0,00	1,80	2,05	66,6
FE3.1	3	HL3.1	850	0,20	0,34	0,18	0,00	1,89	1,70	63,8
FE3.2		HL3.2	1 130	0,22	0,45	0,24	0,00	1,92	2,03	84,8

Vz. – číslo vzorku, Zk. – číslo zkumavky, ve které probíhala kultivace, HL – číslo hrubého lyzátu, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA

⇒ DNA byla izolována v koncentraci 850–1 130 ng·µl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 63,8–84,8 µg.

7.2.1 Smísení dvojic vzorků

Aby bylo možné provést izolaci pomocí magnetických částic, byla DNA izolovaná fenolovou extrakcí smísená. Mísily se vždy roztoky DNA izolované z kultur narostlých ve stejné zkumavce (např. FE1.1 s FE1.2). Výsledná koncentrace je uvedena v tabulce 7-4. Koncentrace byla zjištěna spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer®.

Tabulka 7-4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA po mísení vzorků

Vz.	Pův. vz.	Zk.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ [-]	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ [-]	m [μg]
				A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}			
FE1	FE1.1	1	1 023	0,19	0,41	0,21	0,01	1,99	2,26	153,4
	FE1.2									
FE2	FE2.1	2	1 058	0,21	0,43	0,22	0,01	1,97	2,10	158,6
	FE2.2									
FE3	FE3.1	3	1 040	0,24	0,42	0,22	0,00	1,93	1,76	156,0
	FE3.2									

Vz. – číslo vzorku, Pův. vz. – číslo původního vzorku, Zk. – číslo zkumavky, ve které probíhala kultivace, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA

⇒ DNA měla koncentraci 1 023–1 058 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 153,4–158,6 μg.

7.3 Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic

Efektivita a účinnost různých druhů magnetických mikročastic byla porovnávána pomocí DNA izolované v kapitole 7.2.

DNA separovaná fenol-chloroformovou extrakcí a smísená pro zvýšení objemu byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročastic (viz kapitola 5.7). Pro malé výchozí množství DNA bylo pipetováno čtvrtinové množství jednotlivých komponent.

Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 12,5 μl TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 μl.

7.3.1 Částice MPG® Uncoated

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated v magnetickém separátoru jsou uvedeny v tabulce 7-5.

Tabulka 7-5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic MPG® Uncoated

Vz.	Vz ₀	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ [-]	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
ME1	FE1	204	0,20	0,41	0,20	0,01	2,06	2,11	2,6	25,6	10,0
ME2	FE2	152	0,13	0,31	0,15	0,00	2,06	2,35	1,9	26,4	7,2
ME2	FE3	200	0,17	0,40	0,20	0,00	2,05	2,35	2,5	26,0	9,6

Vz. – číslo vzorku, Vz₀ – číslo výchozího vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 152–204 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 1,9–2,6 μg.

⇒ Izolováno bylo 7,2–10,0% původního množství DNA.

7.3.2 Hypersíťované mikročastice

Množství a čistota DNA izolované hypersíťovanými mikročasticemi v magnetickém separátoru jsou uvedeny v tabulce 7-6.

Tabulka 7-6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí hypersíťovaných magnetických mikročásteček

Vz.	Vz ₀	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
ME1	FE1	206	0,17	0,42	0,21	0,00	2,05	2,53	2,6	25,6	10,1
ME2	FE2	162	0,14	0,33	0,17	0,01	1,99	2,53	2,0	26,4	7,7
ME3	FE3	196	0,17	0,40	0,20	0,00	2,03	2,31	2,5	26,0	9,4

Vz. – číslo vzorku, Vz₀ – číslo výchozího vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 162–206 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 2,0–2,6 μg.

⇒ Izolováno bylo 7,7–10,1 % původního množství DNA.

7.3.3 Magnetické mikročástečky Fkol-135ox

Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA po izolaci magnetickými mikročástečkami Fkol-135ox v magnetickém separátoru jsou uvedeny v tabulce 7-7.

Tabulka 7-7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických mikročásteček Fkol-135ox

Vz.	Vz ₀	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
ME1	FE1	167	0,26	0,45	0,32	0,11	1,64	2,23	2,1	25,6	8,1
ME2	FE2	161	0,26	0,45	0,32	0,12	1,62	2,40	2,0	26,4	7,6
ME3	FE3	199	0,33	0,53	0,38	0,13	1,65	2,01	2,5	26,0	9,6

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 161–199 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 2,0–2,5 μg.

⇒ Izolováno bylo 7,6–9,6 % původního množství DNA.

7.3.4 Magnetické mikročástečky Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických mikročásteček Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal v magnetickém separátoru viz tabulka 7-8.

Tabulka 7-8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických mikročásteček Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Vz.	Vz ₀	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A_{260nm}/A_{280nm} [-]	A_{260nm}/A_{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
ME1	FE1	130	0,14	0,27	0,14	0,01	2,01	1,90	1,6	25,6	6,3
ME2	FE2	46	0,07	0,11	0,07	0,02	1,74	1,77	0,6	26,4	2,2
ME3	FE3	90	0,09	0,18	0,09	0,00	1,99	2,16	1,1	26,0	4,3

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 46–130 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 0,6–1,6 μg.

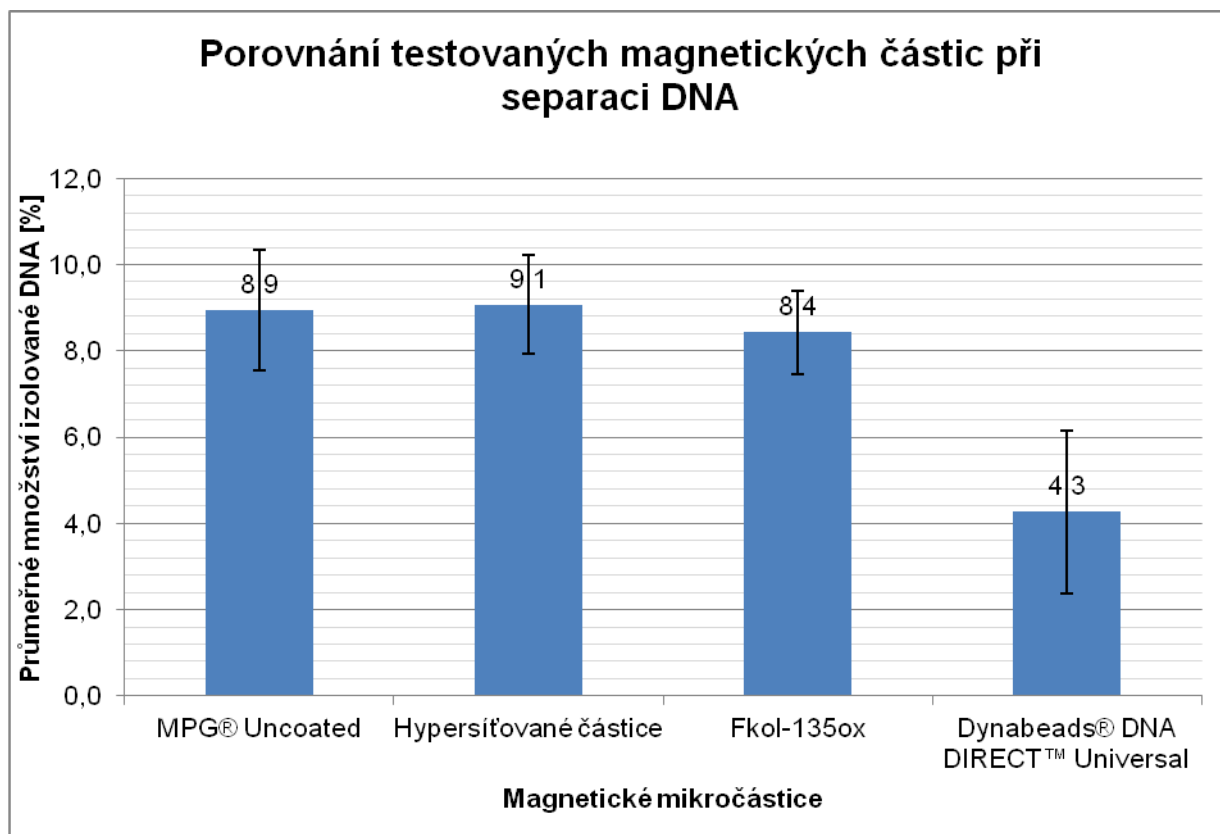
⇒ Izolováno bylo 2,2–6,3% původního množství DNA.

7.4 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA

Protože výchozí koncentrace vzorků (FE1, FE2 a FE3) byly přibližně stejné, můžeme výsledky považovat za trojnásobné opakování stejného pokusu. Do grafu 7-1 proto byly vyneseny průměrné hodnoty a chybové úsečky.

Průměrná množství DNA izolovaná jednotlivými částicemi byla: 8,9% (částice MPG® Uncoated), 9,1% (hypersíťované částice), 8,4% (částice Fkol-135ox) a 4,3% (částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal).

Účinnost magnetických mikročásteček při separaci DNA v magnetickém separátoru je uvedena v grafu 7-1.



Graf 7-1 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA

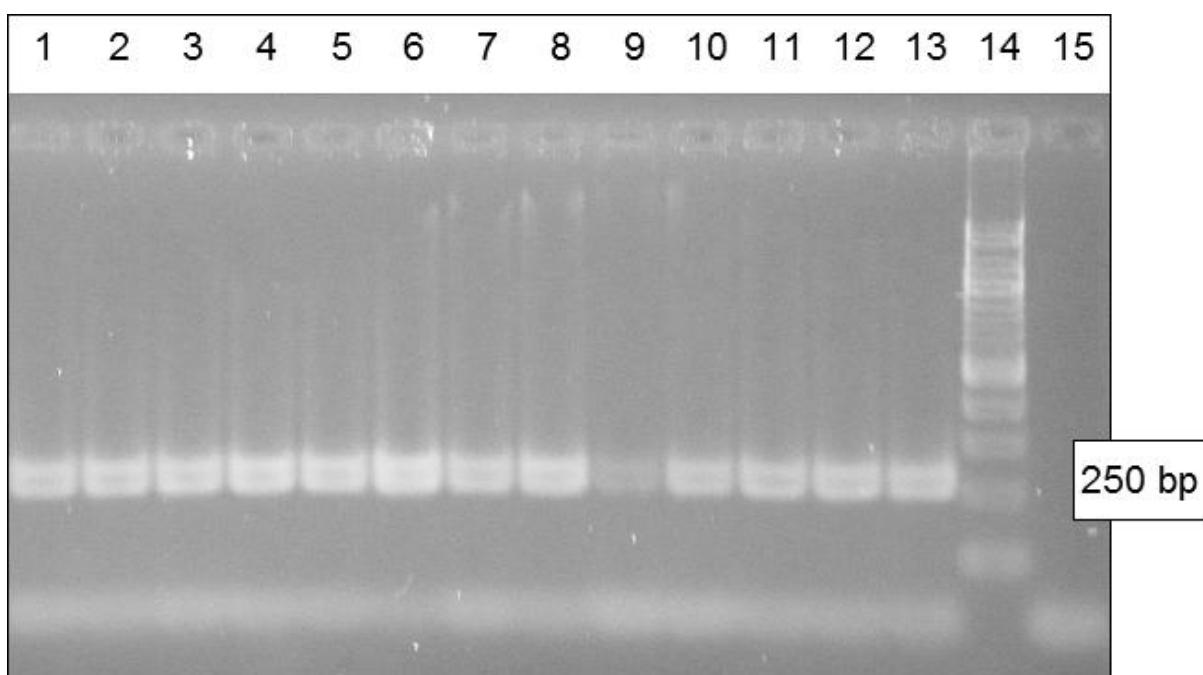
Největší množství DNA bylo izolováno hypersíťovanými magnetickými mikročasticemi (vzorky ME1, ME2) resp. částicemi MPG® Uncoated a Fkol-135ox (vzorek ME3). Množství izolované DNA bylo 10,1 % (vzorek ME1) resp. 7,7 % (vzorek ME2) resp. 9,6 % (vzorek ME3).

⇒ Nejúčinnější při separaci DNA byly hypersíťované magnetické mikročastice, následované magnetickými mikročasticemi MPG® Uncoated. Nejméně účinné byly částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal.

7.5 Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná magnetickými mikročasticemi v magnetickém separátoru byla naředěna na koncentraci $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí PCR s primery LbLMA1-rev a R16-1 podle postupu uvedeného v kapitole 5.11.

Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy (viz obrázek 7-2). Vyhodnocení intenzity produktů PCR je uvedeno v tabulce 7-9. Všechny fragmenty měly stejnou délku jako pozitivní kontrola a délka byla přibližně 250bp.



Obrázek 7-2 Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (250bp)

Tabulka 7-9 Vyhodnocení průběhu PCR

Běh	Vzorek	Magnetické mikročástice	Detekce PCR produktu
1	ME3	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
2		Fkol-135ox	+
3		Hypersíťované mikročástice	+
4		MPG® Uncoated	+
5	ME2	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
6		Fkol-135ox	+
7		Hypersíťované mikročástice	+
8		MPG® Uncoated	+
9	ME1	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	(+)
10		Fkol-135ox	+
11		Hypersíťované mikročástice	+
12		MPG® Uncoated	+
13	Pozitivní kontrola	-	+
14	Žebříček 100bp	-	-
15	Negativní kontrola	-	-

- produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl detekován, (+) produkt PCR byl slabě detekován

⇒ DNA se amplifikovala v PCR za vzniku specifických produktů.

8 Testování různých množství magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace

Závislost množství eluované DNA na koncentraci magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťovaných částic (viz kapitola 4.4) byla porovnávána pomocí DNA kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T.

8.1 Příprava hrubých lyzátů buněk

Kultivace bakteriálních buněk kultury *L. rhamnosus* CCM 1825^T probíhala podle postupu uvedeného v kapitole 5.1. Naměřená optická hustota nárůstu buněk ($A_{600\text{nm}}$) je uvedena v tabulce 8-1.

Tabulka 8-1 Optická hustota nárůstu buněk

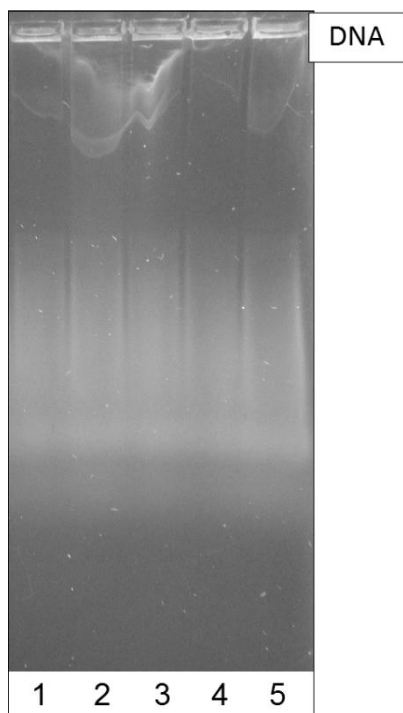
Zkumavka	$A_{600\text{nm}}$ [-]			
	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr
4	0,774	0,783	0,777	0,778
5	0,798	0,82	0,81	0,809
6	0,798	0,828	0,82	0,815
7	0,791	0,843	0,842	0,825
8	0,74	0,782	0,77	0,764
9	0,737	0,743	0,746	0,742
10	0,882	0,842	0,771	0,832
11	0,783	0,81	0,796	0,796
12	0,738	0,819	0,787	0,781
13	0,765	0,819	0,832	0,805

⇒ Buňky narostly do OD 0,74–0,83.

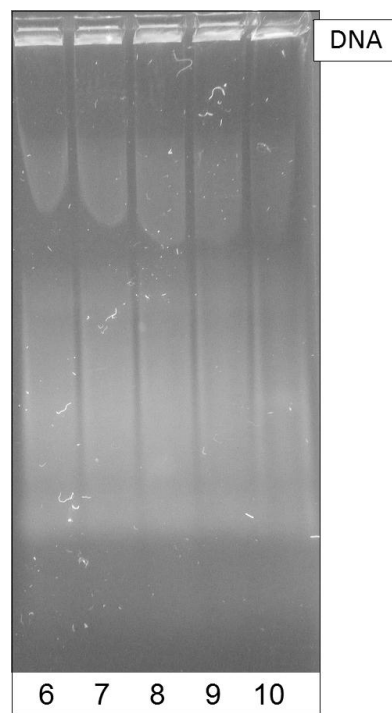
Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 3 × 1,5ml buněčné kultury podle kapitoly 5.3.1. Hrubý lyzát HL4.1 a HL4.2 byl připraven z kultury narostlé ve zkumavce 4, hrubý lyzát HL5.1 a HL5.2 byl připraven ze zkumavky 5, hrubý lyzát HL6.1 a HL6.2 byl připraven ze zkumavky 6, atd.

8.1.1 Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk

Část hrubých lyzátů vzorků byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu (HL4.1, HL5.1, HL6.1, ... HL13.1). Výsledek agarózové gelové elektroforézy hrubých lyzátů buněk je uveden na obrázku 8-1 a 8-2. Popis obrázků je uveden v tabulce 8-2.



Obrázek 8-1 Agarózová gelová elektroforéza hrubého lyzátu buněk (HL4.1–HL8.1)



Obrázek 8-2 Agarózová gelová elektroforéza hrubého lyzátu buněk (HL9.1–HL13.1)

Tabulka 8-2 Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk (HL4.1–HL13.1)

Běh	Hrubý lyzát	Běh	Hrubý lyzát
1	HL4.1	6	HL9.1
2	HL5.1	7	HL10.1
3	HL6.1	8	HL11.1
4	HL7.1	9	HL12.1
5	HL8.1	10	HL13.1

⇒ DNA byla na gelu přítomna.

8.2 Izolace DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

Hrubé lyzáty byly použity pro fenol-chloroformovou extrakci DNA (viz kapitola 5.5). Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 75 μ l TE pufru.

Izolovaná DNA byla podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 50, množství nanášené DNA bylo 0,7 μ l. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8-3.

Tabulka 8-3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí fenol-chloroformové extrakce

Vz.	HL	Zk.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]
				A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}			
FE4.1	HL4.1	4	3 900	0,68	1,56	0,77	0,01	2,02	2,30	292,5
FE4.2	HL4.2		4 013	0,71	1,61	0,79	0,01	2,04	2,27	300,9
FE5.1	HL5.1	5	3 990	0,70	1,60	0,79	0,01	2,03	2,28	299,3
FE5.2	HL5.2		3 320	0,57	1,33	0,65	0,01	2,05	2,34	249,0
FE6.1	HL6.1	6	3 348	0,58	1,34	0,65	0,01	2,08	2,34	251,1
FE6.2	HL6.2		2 838	0,48	1,14	0,54	0,00	2,10	2,40	212,8
FE7.1	HL7.1	7	3 508	0,61	1,40	0,68	0,01	2,07	2,33	263,1
FE7.2	HL7.2		3 763	0,65	1,51	0,73	0,01	2,06	2,32	282,2
FE8.1	HL8.1	8	3 900	0,69	1,56	0,78	0,01	2,01	2,28	292,5
FE8.2	HL8.2		3 368	0,57	1,35	0,66	0,01	2,07	2,37	252,6
FE9.1	HL9.1	9	4 068	0,72	1,63	0,80	0,01	2,04	2,29	305,1
FE9.2	HL9.2		3 988	0,69	1,60	0,78	0,01	2,05	2,31	299,1
FE10.1	HL10.1	10	3 288	0,56	1,32	0,64	0,00	2,05	2,34	246,6
FE10.2	HL10.2		4 115	0,73	1,65	0,82	0,01	2,02	2,27	308,6
FE11.1	HL11.1	11	3 478	0,60	1,39	0,68	0,01	2,05	2,34	260,8
FE11.2	HL11.2		3 190	0,56	1,28	0,63	0,01	2,04	2,32	239,3
FE12.1	HL12.1	12	3 445	0,59	1,38	0,68	0,01	2,04	2,34	258,4
FE12.2	HL12.2		3 543	0,61	1,42	0,69	0,01	2,07	2,34	265,7
FE13.1	HL13.1	13	2 770	0,48	1,11	0,54	0,00	2,07	2,34	207,8
FE13.2	HL13.2		3 195	0,55	1,28	0,62	0,01	2,08	2,35	239,6

Vz. – číslo vzorku, Zk. – číslo zkumavky, ve které probíhala kultivace, HL – číslo hrubého lyzátu, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA

⇒ DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí v koncentraci 2 770–4 115 ng·μl⁻¹.
Množství izolované DNA bylo 207,8–308,6 μg.

8.2.1 Smísení vzorků

Aby bylo možné provést izolaci pomocí magnetických částic, byla DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí smísená. Smísením vznikly vzorky A a B, které obsahovaly izoláty FE4.1 až FE8.2 (vzorek A) a FE9.1 až FE13.2 (vzorek B). Výsledná koncentrace vzorků A a B je uvedena v tabulce 8-4. Koncentrace byla měřena spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometer®.

Tabulka 8-4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA *L. rhamnosus* CCM 1825^T po fenolové extrakci a následném smísení vzorků

Vz.	Pův. vz.	Zk.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]
				A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}			
A	FE4.1 - FE8.2	4 - 8	3 598	0,64	1,45	0,71	0,01	2,04	2,28	2 698,1
B	FE9.1 - FE13.1	9 - 13	3 615	0,64	1,45	0,72	0,01	2,03	2,29	2 711,3

Vz. – číslo vzorku, Pův. vz. – čísla původních vzorků, Zk. – čísla zkumavek, ve kterých probíhala kultivace, c – koncentrace DNA, m – hmotnost DNA

⇒ DNA měla koncentraci 3598–3615 ng·μl⁻¹. Množství DNA bylo 2698,1–2711,3 μg.

8.3 Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic různých koncentrací

Efektivita a účinnost různých druhů magnetických mikročastic při různých koncentracích byla porovnávána pomocí DNA izolované v kapitole 8.2.

Za výchozí koncentraci částic bylo považováno 2 mg·ml⁻¹, v případě magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal se za výchozí koncentraci považuje koncentrace částic, ve které jsou částice dodávány výrobcem (koncentraci částic výrobce neuvádí).

DNA byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročastic (viz kapitola 5.7). Pro malé výchozí množství DNA bylo pipetováno vždy čtvrtinové množství komponent. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 25 μl TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 0,7 μl.

8.3.1 Izolace DNA pomocí 2,5krát koncentrovaných magnetických částic (5 mg·ml⁻¹)

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných magnetických částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 8-5.

Izolace byla provedena s částicemi o koncentraci 5 mg·ml⁻¹ resp. 2,5krát koncentrovanými částicemi.

Tabulka 8-5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic o 2,5násobné koncentraci

Vz.	Částice	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
A	MPG	274	0,25	0,57	0,28	0,02	2,06	2,33	6,9	90,0	7,6
	HPS	148	0,13	0,30	0,15	0,01	2,04	2,41	3,7		4,1
	Fkol	252	0,41	0,66	0,45	0,16	1,71	1,99	6,3		7,0
	DB	197	0,18	0,40	0,20	0,01	2,04	2,32	4,9		5,5
B	MPG	270	0,27	0,56	0,28	0,02	2,03	2,16	6,7	90,4	7,5
	HPS	125	0,11	0,25	0,12	0,00	2,08	2,40	3,1		3,5
	Fkol	230	0,41	0,64	0,46	0,18	1,63	1,95	5,8		6,4
	DB	112	0,09	0,22	0,11	0,00	2,02	2,38	2,8		3,1

Vz. – číslo vzorku, c_m – koncentrace magnetických mikročastic, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

DNA byla izolována v koncentraci 112–274 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 2,8–6,9 μg. Izolováno bylo 3,1–7,6% původního množství DNA.

⇒ Největší množství DNA bylo izolováno pomocí částic MPG® Uncoated (6,9 μg).

8.3.2 Izolace DNA pomocí 1krát koncentrovaných magnetických částic (2 mg·ml⁻¹)

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných magnetických částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 8-6.

Izolace byla provedena s částicemi o koncentraci 2 mg·ml⁻¹ resp. částicemi o výchozí koncentraci.

Tabulka 8-6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty eluované DNA izolované pomocí magnetických částic o výchozí koncentraci

Vz.	Částice	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
A	MPG	98	0,08	0,20	0,10	0,00	2,02	2,48	2,5	90,0	2,7
	HPS	131	0,11	0,26	0,13	0,00	2,06	2,53	3,3		3,6
	Fkol	126	0,16	0,29	0,17	0,04	1,88	2,03	3,2		3,5
	DB	94	0,08	0,19	0,09	0,00	2,09	2,29	2,4		2,6
B	MPG	66	0,05	0,13	0,07	0,00	1,97	2,81	1,7	90,4	1,8
	HPS	98	0,08	0,20	0,10	0,00	1,99	2,32	2,4		2,7
	Fkol	99	0,15	0,24	0,16	0,04	1,73	1,79	2,5		2,7
	DB	46	0,04	0,09	0,05	0,00	1,96	2,36	1,2		1,3

Vz. – číslo vzorku, c_M – koncentrace magnetických mikročástic, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

DNA byla izolována v koncentraci 46–131 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 1,2–3,3 μg. Izolováno bylo 1,3–3,6 % původního množství DNA.

⇒ Největší množství DNA bylo izolováno pomocí hypersíťovaných částic (3,3 μg).

8.3.3 Izolace DNA pomocí 0,5krát koncentrovaných magnetických částic (1 mg·ml⁻¹)

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných magnetických částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 8-7.

Izolace byla provedena s částicemi o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ resp. 0,5krát koncentrovanými částicemi.

Tabulka 8-7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic o poloviční koncentraci

Vz.	Částice	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
			A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
A	MPG	79	0,06	0,16	0,08	0,00	2,04	2,66	2,0	90,0	2,2
	HPS	95	0,08	0,19	0,09	0,00	2,04	2,50	2,4		2,6
	Fkol	65	0,06	0,14	0,08	0,01	1,94	2,50	1,6		1,8
	DB	113	0,10	0,23	0,11	0,00	2,05	2,35	2,8		3,1
B	MPG	46	0,04	0,09	0,05	0,00	1,96	2,30	1,2	90,4	1,3
	HPS	65	0,05	0,13	0,07	0,00	2,00	2,41	1,6		1,8
	Fkol	59	0,06	0,13	0,07	0,01	1,86	2,39	1,5		1,6
	DB	55	0,05	0,11	0,05	0,00	1,98	2,18	1,4		1,5

Vz. – číslo vzorku, c_M – koncentrace magnetických mikročástic, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

DNA byla izolována v koncentraci $46\text{--}113\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Množství izolované DNA bylo $1,2\text{--}2,8\mu\text{g}$. Izolováno bylo 1,3–3,1% původního množství DNA.

⇒ Největší množství DNA bylo izolováno pomocí částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal ($2,8\mu\text{g}$).

8.3.4 Izolace DNA pomocí 0,25krát koncentrovaných magnetických částic ($0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných magnetických částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 8-8.

Izolace byla provedena s částicemi o koncentraci $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ resp. 0,25krát koncentrovanými částicemi.

Tabulka 8-8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic o čtvrtinové koncentraci

Vz.	Částice	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	Absorbance [-]				$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ [-]	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ [-]	m [μg]	m_0 [μg]	Množství izolované DNA [%]
			$A_{230\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{320\text{nm}}$					
A	MPG	52	0,04	0,11	0,05	0,00	2,00	2,67	1,3	90,0	1,4
	HPS	78	0,06	0,16	0,08	0,00	2,07	2,50	1,9		2,2
	Fkol	58	0,05	0,12	0,06	0,01	2,00	2,47	1,5		1,6
	DB	81	0,09	0,16	0,08	0,00	2,03	1,95	2,0		2,3
B	MPG	52	0,05	0,11	0,05	0,00	2,00	2,31	1,3	90,4	1,4
	HPS	49	0,04	0,10	0,05	0,00	2,06	2,37	1,2		1,3
	Fkol	52	0,08	0,11	0,08	0,01	1,46	1,49	1,3		1,4
	DB	38	0,03	0,08	0,04	0,00	2,08	2,27	0,9		1,0

Vz. – číslo vzorku, c_M – koncentrace magnetických mikročástic, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m_0 – hmotnost DNA v separačním roztoku

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

DNA byla izolována v koncentraci $38\text{--}81\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Množství izolované DNA bylo $0,9\text{--}2,0\mu\text{g}$. Izolováno bylo 1,0–2,3% původního množství DNA.

⇒ Největší množství DNA bylo izolováno pomocí částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal ($2,0\mu\text{g}$).

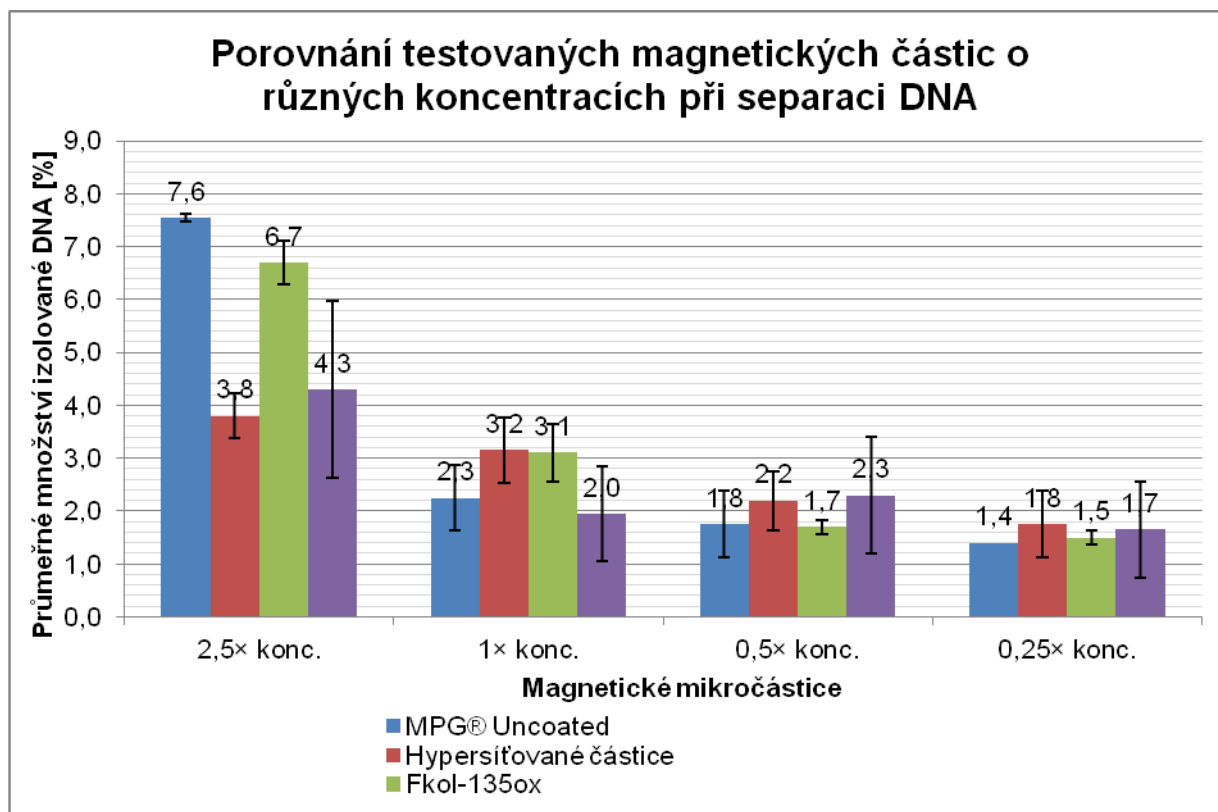
8.4 Porovnání testovaných magnetických částic o různých koncentracích při separaci DNA

Protože výchozí koncentrace vzorků A a B byly přibližně stejné, můžeme výsledky považovat za opakování stejného pokusu. Do grafu byly proto vyneseny průměrné hodnoty.

Průměrná množství DNA izolovaná jednotlivými částicemi o různých koncentracích jsou uvedena v tabulce 8-9. Účinnost magnetických mikročástic při separaci DNA v magnetickém separátoru je znázorněna v grafu 8-1.

Tabulka 8-9 Množství DNA izolované magnetickými mikročasticemi v závislosti na koncentraci magnetických mikročastic a typu mikročastic

Koncentrace částic	Částice	Průměrné množství izolované DNA [%]
5 mg·ml ⁻¹ (2,5× konc.)	MPG® Uncoated	7,6
	Hypersíťované částice	3,8
	Fkol-135ox	6,7
	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	4,3
2 mg·ml ⁻¹ (výchozí)	MPG® Uncoated	2,3
	Hypersíťované částice	3,2
	Fkol-135ox	3,1
	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	2,0
1 mg·ml ⁻¹ (0,5× konc.)	MPG® Uncoated	1,8
	Hypersíťované částice	2,2
	Fkol-135ox	1,7
	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	2,3
0,5 mg·ml ⁻¹ (0,25× konc.)	MPG® Uncoated	1,4
	Hypersíťované částice	1,8
	Fkol-135ox	1,5
	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	1,65



Graf 8-1 Porovnání testovaných magnetických částic o různých koncentracích při separaci DNA

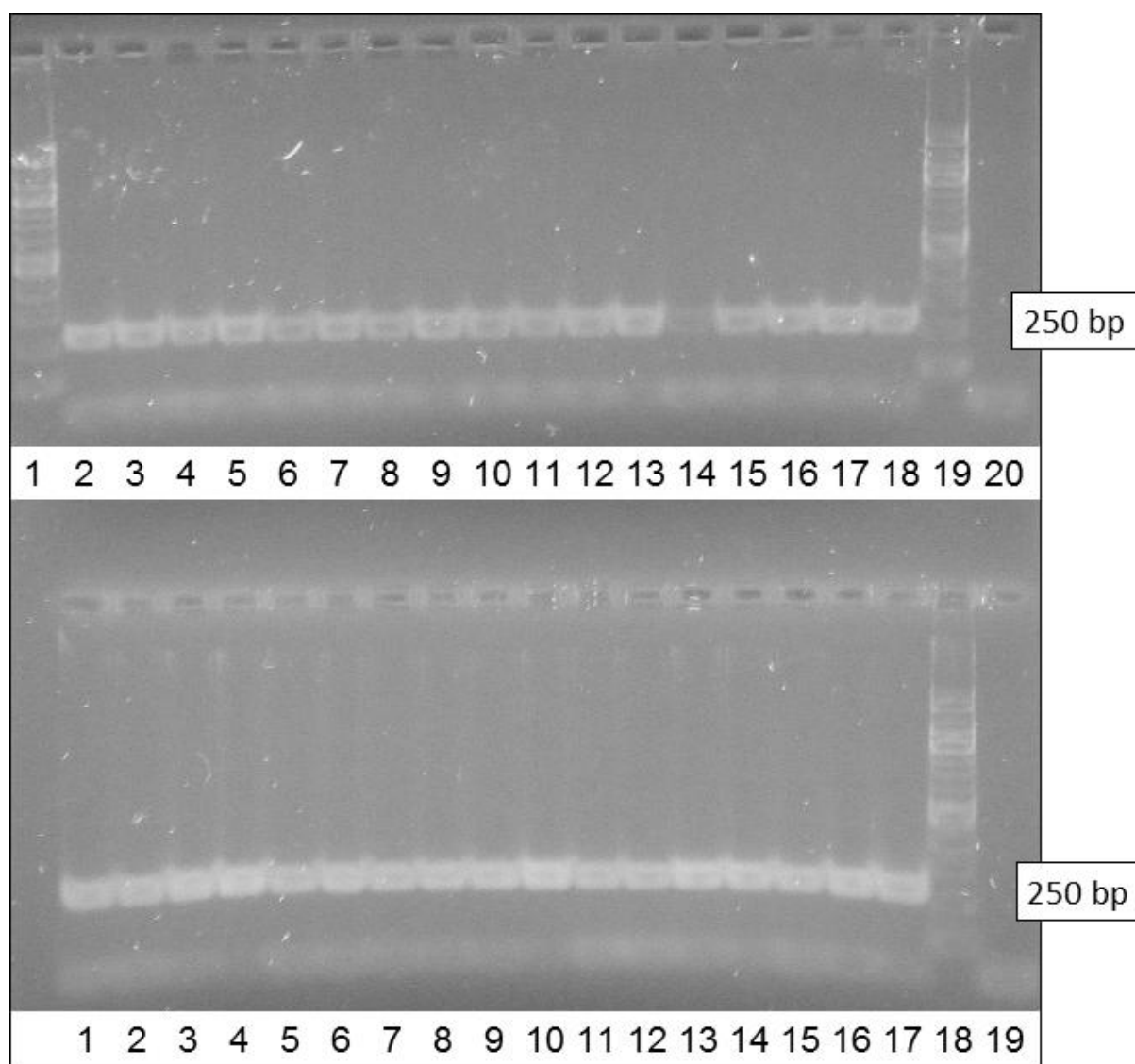
Největší množství DNA bylo izolováno hypersítovanými magnetickými mikročasticemi (vzorky ME1, ME2) resp. částicemi MPG® Uncoated a Fkol-135ox (vzorek ME3). Množství izolované DNA bylo 10,1 % (vzorek ME1) resp. 7,7 % (vzorek ME2) resp. 9,6 % (vzorek ME3).

⇒ Nejúčinnější při separaci DNA byly hypersítované magnetické mikročastice, následované magnetickými mikročasticemi MPG® Uncoated. Nejméně účinné byly částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (viz graf 8-1).

8.5 Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná magnetickými mikročasticemi o různých koncentracích byla naředěna na koncentraci $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí PCR s primery LbLMA1-rev a R16-1 podle postupu uvedeného v kapitole 5.11.

Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy (viz obrázek 8-3). Vyhodnocení intenzity produktů PCR je uvedeno v tabulce 8-10. Všechny fragmenty měly stejnou délku jako pozitivní kontrola a délka byla přibližně 250 bp.



Obrázek 8-3 Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (250bp)

Tabulka 8-10 Vyhodnocení průběhu PCR

Část gelu	Pův. vz.	Běh	Koncentrace	Popis	Detekce PCR produktu
Horní	A	1	-	Žebříček 100bp	-
		2	0,5mg·ml ⁻¹ (0,25násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		3		Fkol-135ox	+
		4		Hypersíťované mikročástice	+
		5		MPG® Uncoated	+
		6	1 mg·ml ⁻¹ (0,5násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		7		Fkol-135ox	+
		8		Hypersíťované mikročástice	+
		9		MPG® Uncoated	+
		10	2mg·ml ⁻¹ (výchozí)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		11		Fkol-135ox	+
		12		Hypersíťované mikročástice	+
		13		MPG® Uncoated	+
		14	5mg·ml ⁻¹ (2,5násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	(+)
		15		Fkol-135ox	+
		16		Hypersíťované mikročástice	+
		17		MPG® Uncoated	+
		18	-	Pozitivní kontrola	+
		19	-	Žebříček 100bp	-
		20	-	Negativní kontrola	-
Dolní	B	1	0,5mg·ml ⁻¹ (0,25násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		2		Fkol-135ox	+
		3		Hypersíťované mikročástice	+
		4		MPG® Uncoated	+
		5	1 mg·ml ⁻¹ (0,5násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		6		Fkol-135ox	+
		7		Hypersíťované mikročástice	+
		8		MPG® Uncoated	+
		9	2mg·ml ⁻¹ (výchozí)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		10		Fkol-135ox	+
		11		Hypersíťované mikročástice	+
		12		MPG® Uncoated	+
		13	5mg·ml ⁻¹ (2,5násobná)	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+
		14		Fkol-135ox	+
		15		Hypersíťované mikročástice	+
		16		MPG® Uncoated	+
		17	-	Pozitivní kontrola	+
		18	-	Žebříček 100bp	-
		19	-	Negativní kontrola	-

Pův. vz. – výchozí vzorek; - produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl detekován, (+) produkt PCR byl slabě detekován

⇒ DNA se amplifikovala v PCR za vzniku specifických produktů.

9 Testování magnetických mikročastic jedné koncentrace při izolaci DNA různých koncentrací

Porovnávána byla závislost množství eluované DNA na výchozím množství DNA. Měření probíhalo pomocí magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťovaných částic (viz kapitola 4.4). DNA byla připravena ředěním DNA izolované z kuřecích erytrocytů TE puforem.

Koncentrace po ředění je uvedena v tabulce 9-1. Měření koncentrace bylo provedeno na přístroji NanoPhotometer® s LID 50, množství nanášené DNA bylo 0,7 µl. Koncentrace DNA nižší než 500 ng·µl⁻¹ byla měřena s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 µl.

Tabulka 9-1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z kuřecích erytrocytů po naředění

Vz.	c [ng·µl ⁻¹]	Absorbance [-]				A_{260nm}/A_{280nm} [-]	A_{260nm}/A_{230nm} [-]
		A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{320nm}		
KE4000	4 028	0,72	1,62	0,89	0,01	1,84	2,26
KE2000	1 990	0,35	0,80	0,43	0,01	1,89	2,33
KE1000	1 033	0,19	0,42	0,23	0,01	1,82	2,28
KE500	505	0,10	0,21	0,12	0,01	1,77	2,15
KE250	268	0,23	0,54	0,29	0,00	1,85	2,30
KE125	137	0,12	0,27	0,15	0,00	1,83	2,31
KE62,5	69	0,05	0,13	0,07	0,00	1,88	2,36

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace DNA

9.1.1 Agarózová gelová elektroforéza výchozích roztoků DNA

Výsledek agarózové gelové elektroforézy DNA z kuřecích erytrocytů o různých koncentracích jsou uvedeny na obrázku 9-1. Popis obrázku je uveden v tabulce 9-2.



Obrázek 9-1 Agarózová gelová elektroforéza DNA z kuřecích erytrocytů o různých koncentracích

Tabulka 9-2 Agarózová gelová elektroforéza roztoků DNA z kuřecích erytrocytů o různých koncentracích

Běh	Vzorek DNA	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
1	KE62,5	69
2	KE125	137
3	KE250	268
4	KE500	505
5	KE1000	1 033
6	KE2000	1 990
7	KE4000	4 028

⇒ Všechny běhy obsahovaly DNA.

9.2 Izolace různých koncentrací DNA pomocí magnetických mikročastic

Ověřována byla efektivita a účinnost magnetických mikročastic v závislosti na koncentraci DNA. Použita byla DNA z kuřecích erytrocytů, jejíž koncentrace byla ředěním upravena na přesné hodnoty.

DNA byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročastic (viz kapitola 5.7). Pipetováno bylo vždy čtvrtinové množství komponent. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 12,5 μl TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 μl.

9.2.1 Částice MPG® Uncoated

Výsledky izolace DNA z kuřecích erytrocytů pomocí částic MPG® Uncoated jsou uvedeny v tabulce 9-3.

Tabulka 9-3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic MPG® Uncoated

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A_{260nm}/A_{280nm} [-]	A_{260nm}/A_{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KE4000	198	0,19	0,40	0,21	0,00	1,86	2,10	2,5	100,7	2,5
KE2000	344	0,31	0,69	0,37	0,01	1,86	2,27	4,3	49,8	8,6
KE1000	206	0,19	0,42	0,23	0,01	1,87	2,23	2,6	25,8	10,0
KE500	119	0,12	0,24	0,14	0,00	1,82	2,13	1,5	12,6	11,8
KE250	52	0,06	0,11	0,06	0,00	1,81	1,91	0,6	6,7	9,6
KE125	25	0,02	0,05	0,03	0,00	1,75	2,23	0,3	3,4	8,9
KE62,5	17	0,02	0,04	0,02	0,00	1,94	1,65	0,2	1,7	12,0

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 17–344 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 0,2–4,3 μg.

⇒ Izolováno bylo 2,5–12,0% původního množství DNA.

9.2.2 Hypersítované částice

Výsledky izolace DNA z kuřecích erytrocytů pomocí hypersítovaných částic jsou uvedeny v tabulce 9-4.

Tabulka 9-4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí hypersítovaných částic

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KE4000	269	0,23	0,54	0,29	0,01	1,86	2,38	3,4	100,7	3,3
KE2000	216	0,20	0,44	0,24	0,01	1,85	2,24	2,7	49,8	5,4
KE1000	265	0,25	0,54	0,29	0,01	1,87	2,22	3,3	25,8	12,8
KE500	130	0,12	0,26	0,14	0,00	1,85	2,29	1,6	12,6	12,8
KE250	57	0,06	0,12	0,06	0,00	1,84	2,11	0,7	6,7	10,6
KE125	23	0,03	0,05	0,03	0,00	1,80	1,73	0,3	3,4	8,2
KE62,5	13	0,02	0,03	0,02	0,00	1,63	1,24	0,2	1,7	9,4

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 13–269 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 0,2–3,4 μg.

⇒ Izolováno bylo 3,3–12,8% původního množství DNA.

9.2.3 Částice Fkol-135ox

Výsledky izolace DNA z kuřecích erytrocytů pomocí částic Fkol-135ox jsou uvedeny v tabulce 9-5.

Tabulka 9-5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí částic Fkol-135ox

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KE4000	167	0,26	0,42	0,29	0,09	1,68	1,92	2,1	100,7	2,1
KE2000	296	0,37	0,68	0,43	0,09	1,76	2,13	3,7	49,8	7,4
KE1000	352	0,42	0,79	0,49	0,09	1,76	2,11	4,4	25,8	17,0
KE500	211	0,28	0,50	0,32	0,08	1,73	2,03	2,6	12,6	20,9
KE250	144	0,24	0,37	0,25	0,08	1,64	1,79	1,8	6,7	26,9
KE125	109	0,21	0,30	0,22	0,08	1,58	1,80	1,4	3,4	39,8
KE62,5	97	0,20	0,28	0,21	0,09	1,55	1,70	1,2	1,7	70,3

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 97–352 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 1,2–4,4 μg.

⇒ Izolováno bylo 2,1–70,3% původního množství DNA.

9.2.4 Částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Výsledky izolace DNA z kuřecích erytrocytů pomocí částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 9-6.

Tabulka 9-6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství izolované DNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KE4000	104	0,10	0,21	0,11	0,00	1,87	2,10	1,3	100,7	1,3
KE2000	92	0,09	0,19	0,10	0,00	1,84	2,09	1,2	49,8	2,3
KE1000	112	0,12	0,23	0,13	0,01	1,84	2,04	1,4	25,8	5,4
KE500	71	0,08	0,15	0,08	0,00	1,82	2,00	0,9	12,6	7,0
KE250	80	0,08	0,16	0,09	0,00	1,79	2,01	1,0	6,7	14,8
KE125	43	0,07	0,09	0,05	0,01	1,81	1,37	0,5	3,4	15,5
KE62,5	25	0,04	0,05	0,03	0,00	1,81	1,32	0,3	1,7	17,8

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 25–112 ng·μl⁻¹. Množství izolované DNA bylo 0,3–1,4 μg.

⇒ Izolováno bylo 1,3–17,8% původního množství DNA.

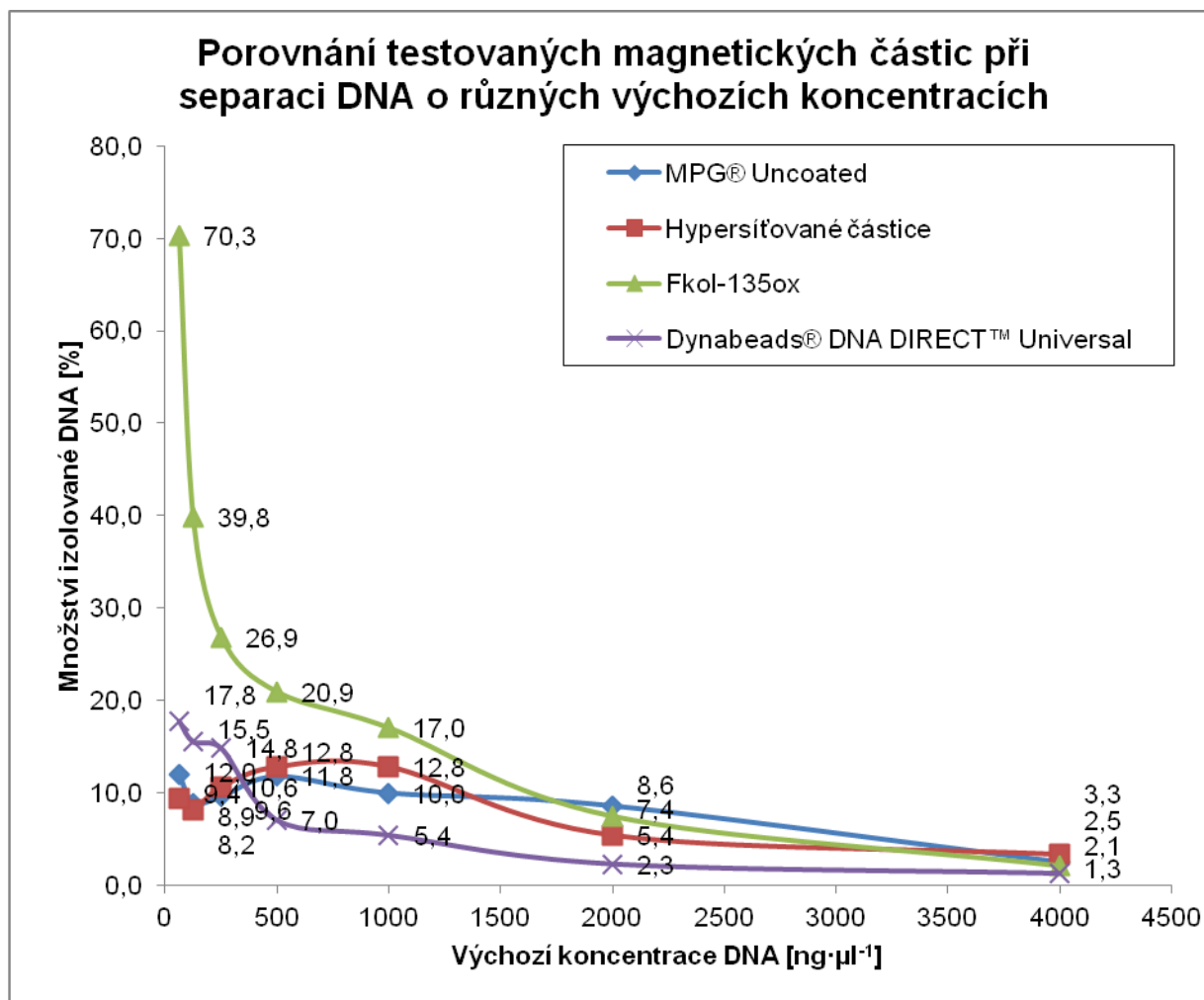
9.3 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA o různých koncentracích

Shrnutí efektivity magnetických mikročástic při separaci DNA z různého výchozího množství DNA je uvedeno v tabulce 9-7. Účinnost magnetických mikročástic při separaci DNA v magnetickém separátoru pro různé výchozí koncentrace DNA je znázorněna v grafu 9-1.

Tabulka 9-7 Efektivita magnetických mikročástic při separaci DNA z různého výchozího množství DNA. Hodnoty jsou uvedeny v procentech.

Výchozí koncentrace DNA [ng·μl ⁻¹]	Částice (2mg·ml ⁻¹ /1× konc.)			
	MPG	HPS	Fkol	DB
4000	2,5	3,3	2,1	1,3
2000	8,6	5,4	7,4	2,3
1000	10,0	12,8	17,0	5,4
500	11,8	12,8	20,9	7,0
250	9,6	10,6	26,9	14,8
125	8,9	8,2	39,8	15,5
62,5	12,0	9,4	70,3	17,8

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal



Graf 9-1 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA o různých výchozích koncentracích

Největší procento DNA bylo izolováno magnetickými mikročásticemi Fkol-135ox (70,3%) a to při výchozí koncentraci DNA $62,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Při výchozích koncentracích DNA vyšších než $1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, byly účinnější částice MPG® Uncoated (koncentrace DNA $2000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) resp. hypersíťované částice (koncentrace DNA $4000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

- ⇒ Nejúčinnější při separaci DNA o nízké počáteční koncentraci byly částice Fkol-135ox. Při vysokých počátečních koncentracích DNA byly účinnější částice MPG® Uncoated a hypersíťované částice.

10 Určení afinity magnetických mikročastic k RNA

Porovnávána byla závislost množství eluované RNA na výchozím množství RNA. Cílem bylo zjistit afinitu magnetických mikročastic k RNA. Měření probíhalo pomocí magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťovaných částic (viz kapitola 4.4). RNA o různých koncentracích byla připravena ředěním sušené kvasinkové RNA v TE pufru pro RNA (viz kapitola 4.5.4).

Koncentrace po ředění je uvedena v tabulce 10-1. Měření koncentrace bylo provedeno na přístroji NanoPhotometer® s LID 50, množství nanášené RNA bylo 0,7 µl.

Tabulka 10-1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty kvasinkové RNA po naředění

Vz.	c [ng·µl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}		
KV3000	2 992	0,56	1,51	0,93	0,01	1,63	2,72
KV2000	1 944	0,37	0,98	0,55	0,01	1,80	2,69
KV1000	1 004	0,20	0,51	0,24	0,00	2,09	2,56
KV500	512	0,10	0,26	0,12	0,00	2,13	2,64

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace RNA

10.1 Testování množství RNA eluované z magnetických mikročastic

Ověřováno bylo množství RNA eluované z magnetických mikročastic v závislosti na výchozí koncentraci RNA. Použita byla kvasinková RNA, jejíž koncentrace byla ředěním upravena na přesné hodnoty.

RNA byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročastic. Použit byl stejný postup jako v případě izolace DNA (viz kapitola 5.7). Pipetováno bylo vždy čtvrtinové množství komponent. RNA byla eluována do 25 µl TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené RNA bylo 3 µl.

10.1.1 Částice MPG® Uncoated

Výsledky eluce kvasinkové RNA z částic MPG® Uncoated jsou uvedeny v tabulce 10-2.

Tabulka 10-2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA eluované z magnetických částic MPG® Uncoated

Vz.	c [ng·µl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [µg]	m ₀ [µg]	Množství eluované RNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KV3000	82	0,09	0,21	0,10	0,00	2,08	2,54	2,1	74,8	2,8
KV2000	54	0,09	0,15	0,09	0,01	1,74	1,72	1,4	48,6	2,8
KV1000	31	0,03	0,08	0,04	0,00	1,95	2,52	0,8	25,1	3,1
KV500	30	0,05	0,08	0,05	0,01	1,76	1,64	0,7	12,8	5,8

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace eluované RNA, m – hmotnost eluované RNA, m₀ – hmotnost RNA v separačním roztoku

RNA byla eluována v koncentraci 30–82 ng·µl⁻¹. Množství eluované RNA bylo 0,7–2,1 µg.

⇒ Eluováno bylo 2,8–5,8% výchozího množství RNA.

10.1.2 Hypersíťované částice

Výsledky eluce kvasinkové RNA z hypersíťovaných částic jsou uvedeny v tabulce 10-3.

Tabulka 10-3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA eluované z hypersíťovaných magnetických částic

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství eluované RNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KV3000	64	0,07	0,16	0,08	0,00	2,05	2,39	1,6	74,8	2,1
KV2000	40	0,04	0,11	0,05	0,00	2,06	2,66	1,0	48,6	2,1
KV1000	28	0,03	0,07	0,04	0,00	2,03	3,00	0,7	25,1	2,7
KV500	22	0,02	0,06	0,03	0,00	1,87	2,43	0,6	12,8	4,4

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace eluované RNA, m – hmotnost eluované RNA, m₀ – hmotnost RNA v separačním roztoku

RNA byla eluována v koncentraci 22–64 ng·μl⁻¹. Množství eluované RNA bylo 0,6–1,6 μg.

⇒ Eluováno bylo 2,1–4,4% výchozího množství RNA.

10.1.3 Částice Fkol-135ox

Výsledky eluce kvasinkové RNA z částic Fkol-135ox jsou uvedeny v tabulce 10-4.

Tabulka 10-4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA eluované z magnetických částic Fkol-135ox

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství eluované RNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KV3000	48	0,08	0,15	0,10	0,03	1,70	2,48	1,2	74,8	1,6
KV2000	61	0,15	0,22	0,17	0,07	1,58	2,04	1,5	48,6	3,1
KV1000	54	0,13	0,21	0,16	0,07	1,47	2,18	1,4	25,1	5,4
KV500	51	0,14	0,20	0,16	0,07	1,45	1,97	1,3	12,8	10,0

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace eluované RNA, m – hmotnost eluované RNA, m₀ – hmotnost RNA v separačním roztoku

RNA byla eluována v koncentraci 48–61 ng·μl⁻¹. Množství eluované RNA bylo 1,2–1,5 μg.

⇒ Eluováno bylo 1,6–10,0% výchozího množství RNA.

10.1.4 Částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Výsledky eluce kvasinkové RNA z částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 10-5.

Tabulka 10-5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA eluované z magnetických částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Vz.	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]	m ₀ [μg]	Množství eluované RNA [%]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}					
KV3000	18	0,03	0,05	0,03	0,00	1,76	1,63	0,4	74,8	0,6
KV2000	19	0,03	0,05	0,03	0,00	1,88	1,88	0,5	48,6	1,0
KV1000	8	0,01	0,02	0,02	0,00	1,43	1,54	0,2	25,1	0,8
KV500	4	0,01	0,01	0,01	0,00	1,57	2,20	0,1	12,8	0,9

Vz. – číslo vzorku, c – koncentrace eluované RNA, m – hmotnost eluované RNA, m₀ – hmotnost RNA v separčním roztoku

RNA byla eluována v koncentraci 4–19 ng·μl⁻¹. Množství eluované RNA bylo 0,1–0,5 μg.

⇒ Eluováno bylo 0,6–1,0% výchozího množství RNA.

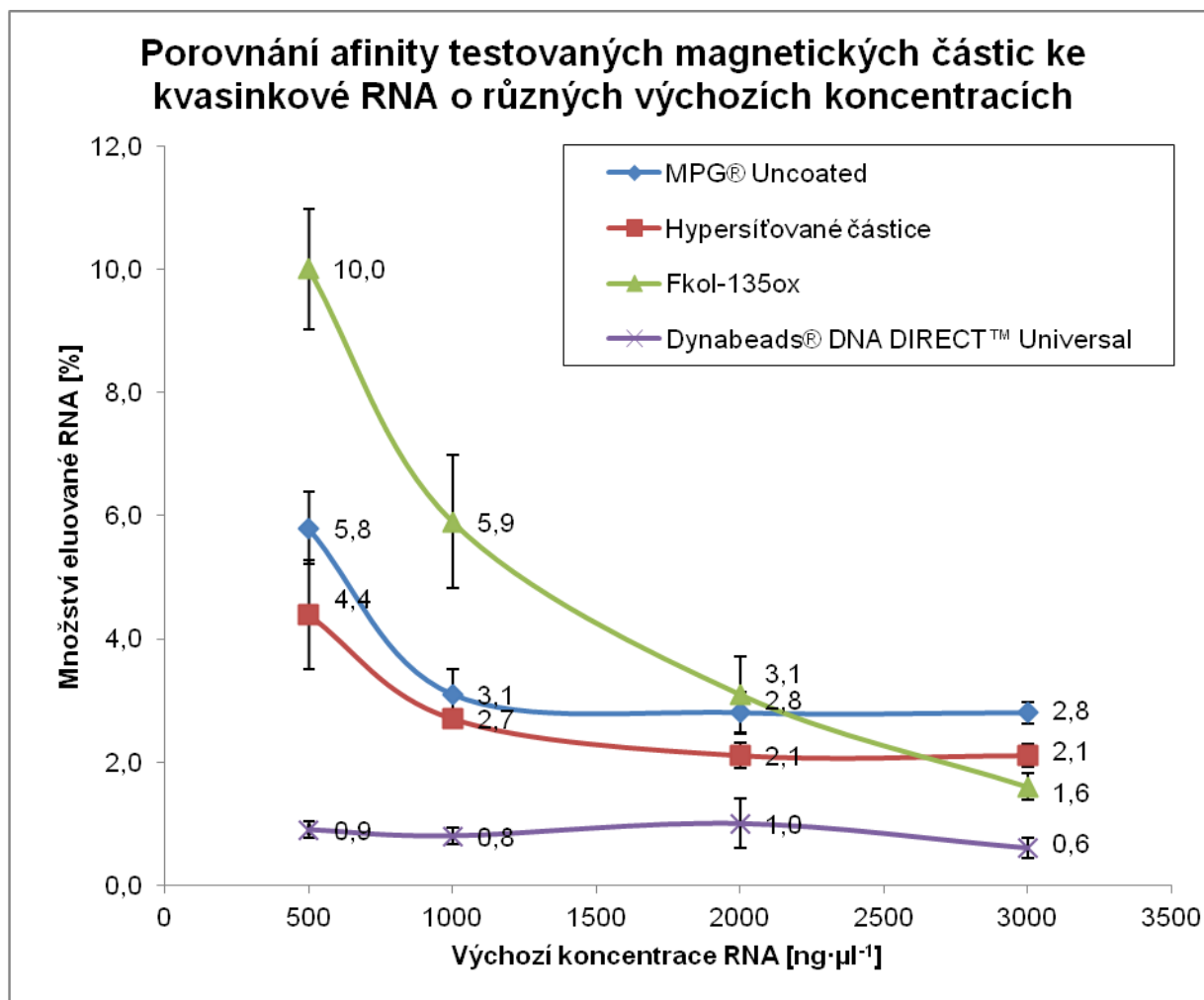
10.2 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci RNA o různých koncentracích

Shrnutí naměřených hodnot afinity magnetických mikročástic k RNA pro různé koncentrace RNA je uvedeno v tabulce 10-6. Afinita magnetických mikročástic k RNA v závislosti na výchozí koncentraci RNA je znázorněna v grafu 10-1.

Tabulka 10-6 Afinita magnetických mikročástic k RNA pro různá výchozí množství RNA. Hodnoty jsou uvedeny v procentech.

Výchozí koncentrace RNA [ng·μl ⁻¹]	Částice (2mg·ml ⁻¹ /1× konc.)			
	MPG	HPS	Fkol	DB
3000	2,8	2,1	1,6	0,6
2000	2,8	2,1	3,1	1,0
1000	3,1	2,7	5,9	0,8
500	5,8	4,4	10,0	0,9

MPG – částice MPG® Uncoated, HPS – hypersíťované částice, Fkol – částice Fkol-135ox, DB – částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal



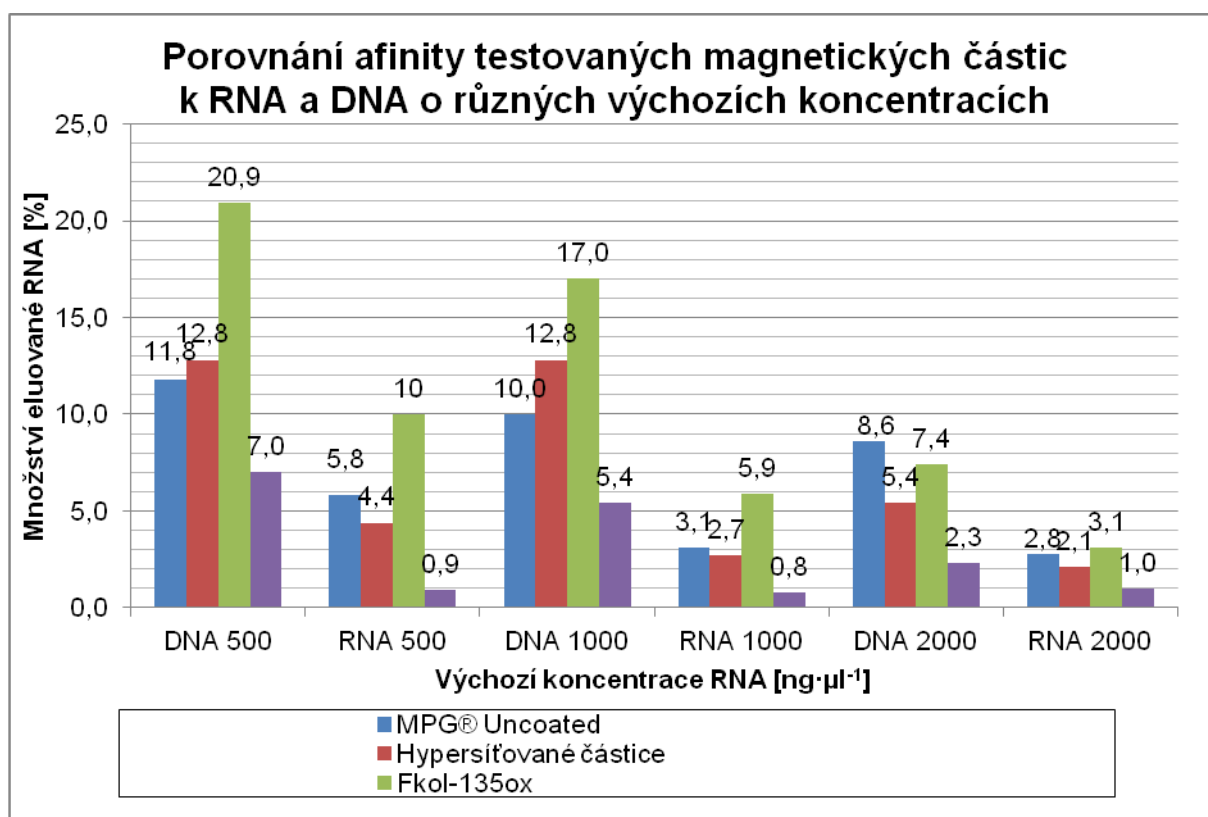
Graf 10-1 Porovnání afinity testovaných magnetických částic ke kvasinkové RNA o různých výchozích koncentracích

Největší procento RNA bylo eluováno z magnetických mikročástic Fkol-135ox (10,0%) a to při výchozí koncentraci RNA 500 ng·μl⁻¹. Při výchozích koncentracích RNA vyšších než 2000 ng·μl⁻¹, bylo vyšší procento RNA eluováno z částic MPG® Uncoated a hypersil®ovaných částic.

- ⇒ Největší procentuální afinita k RNA je při nízkých koncentracích. Největší afinitu k RNA při nízkých koncentracích mají částice Fkol-135ox, při vysokých koncentracích (nad 2000 ng·μl⁻¹) částice MPG® Uncoated.
- ⇒ Nejnížší procentuální afinitu k RNA vykazovaly částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal a to v celém rozmezí koncentrací.

10.3 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci RNA o různých koncentracích

Porovnání afinity magnetických částic k DNA z kuřecích erytrocytů a kvasinkové RNA je znázorněno v grafu 10-2.



Graf 10-2 Porovnání afinity testovaných magnetických mikročástic k RNA a DNA o různých výchozích koncentracích

⇒ Magnetické mikročástice mají v závislosti na koncentraci DNA a RNA ve vzorku 2–7krát vyšší afinitu k DNA než k RNA.

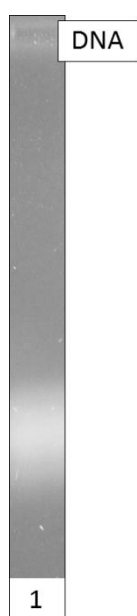
11 Porovnání různých druhů magnetických částic při izolaci DNA z mléčných výrobků

Schopnost různých druhů magnetických mikročástic izolovat DNA rodu *Lactobacillus* z komplexních mléčných výrobků byla otestována na mléčném nápoji Actimel a doplňku stravy Linex® Forte. Porovnávány byly částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol 135ox a hypersíťované částice (viz kapitola 4.4).

11.1 Mléčný výrobek Actimel

11.1.1 Příprava hrubých lyzátů buněk

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z $2 \times 1,5$ ml buněčné kultury podle kapitoly 5.3.2 a jeho část byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu. Výsledek agarózové gelové elektroforézy hrubého lyzátu buněk je uveden na obrázku 11-1.



Obrázek 11-1 Agarózová gelová elektroforéza hrubého lyzátu buněk z mléčného výrobku Actimel

⇒ DNA byla na gelu přítomna.

11.1.2 Zakoncentrování hrubých lyzátů

Hrubé lyzáty buněk z mléčného výrobku Actimel byly 4násobně zakoncentrovány pomocí srážení ethanolem (viz kapitola 5.5.2). 400 µl hrubého lyzátu buněk přesráženo ethanolem a rozpuštěno ve 100 µl TE pufru.

11.1.3 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic

DNA ze zkoncentrovaného hrubého lyzátu byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročástic (viz kapitola 5.7). Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 12,5 µl TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 µl.

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných mikročástic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 11-1.

Tabulka 11-1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Částice	c [ng·μl ⁻¹]	Absorbance [-]				A _{260nm} / A _{280nm} [-]	A _{260nm} / A _{230nm} [-]	m [μg]
		A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}			
MPG	82	0,56	0,28	0,23	0,12	1,43	0,36	1,0
HPS	53	0,32	0,18	0,14	0,07	1,46	0,42	0,7
Fkol	83	0,37	0,26	0,20	0,09	1,49	0,60	1,0
DB	57	0,33	0,20	0,16	0,08	1,43	0,46	0,7

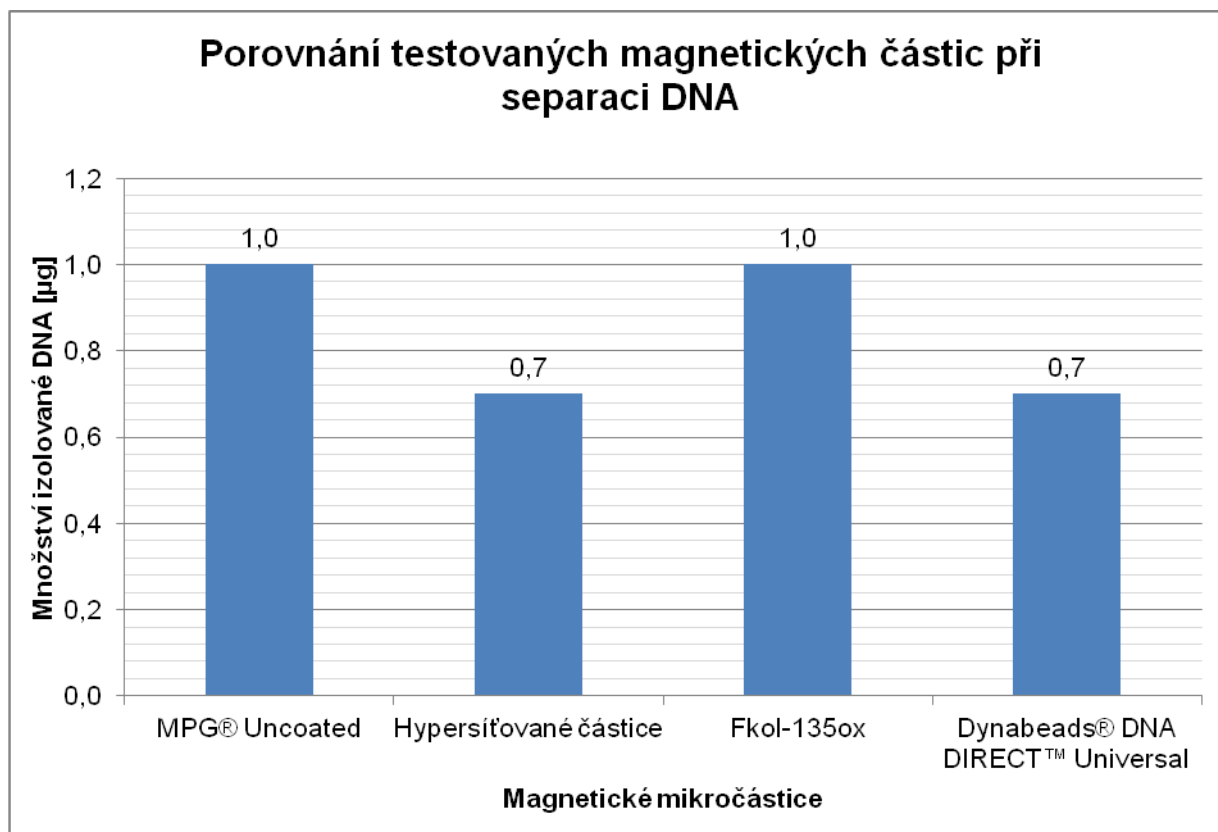
Vz. – číslo vzorku, Vz₀ – číslo výchozího vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci 53–83 ng·μl⁻¹.

⇒ Izolováno bylo 0,7–1,0 μg DNA.

11.1.4 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA z mléčného výrobku Actimel

Účinnost magnetických mikročástic při separaci DNA v magnetickém separátoru pro jednotlivé typy magnetických mikročástic je znázorněna v grafu 11-1.



Graf 11-1 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA

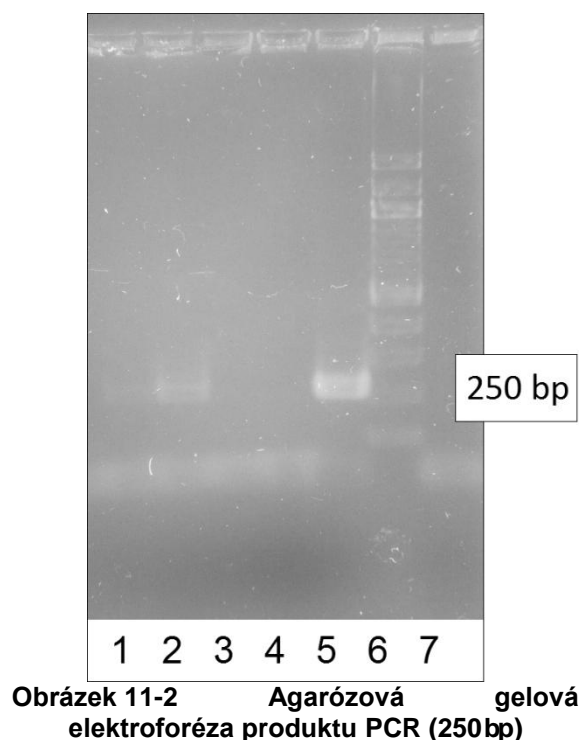
Největší množství DNA bylo izolováno částicemi MPG® Uncoated a Fkol-135ox. Množství izolované DNA bylo 1,0 μg.

⇒ Při separaci DNA z mléčného výrobku Actimel byly neúčinnější částice MPG® Uncoated a Fkol-135ox.

11.1.5 Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná magnetickými mikročásticemi v magnetickém separátoru byla naředěna na koncentraci $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí PCR s primery LbLMA1-rev a R16-1 podle postupu uvedeného v kapitole 5.11. Do směsi pro PCR bylo pipetováno $10\mu\text{l}$ DNA matrice. Pro zachování objemu PCR směsi bylo množství vody pro PCR sníženo na $10\mu\text{l}$.

Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy (viz obrázek 11-2). Vyhodnocení intenzity produktů PCR je uvedeno v tabulce 11-2. DNA získaná izolací částicemi Fkol-135ox a Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal byla amplifikována za vzniku specifických produktů. Jejich fragmenty měly stejnou délku jako pozitivní kontrola a jejich délka byla přibližně 250bp. DNA izolovanou pomocí částic MPG® Uncoated a hypersíťovaných částic se nepodařilo amplifikovat, ačkoliv izolace DNA i následná amplifikace byla několikrát opakována.



Tabulka 11-2 Vyhodnocení průběhu PCR (mléčný výrobek Actimel)

Běh	Popis	Detekce PCR produktu
1	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	(+)
2	Fkol-135ox	+
3	Hypersíťované mikročástice	-
4	MPG® Uncoated	-
5	Pozitivní kontrola	+
6	Žebříček	-
7	Negativní kontrola	-

- produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl detekován, (+) produkt PCR byl slabě detekován

- ⇒ DNA izolovaná pomocí magnetických částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal a Fkol-135ox se amplifikovala v PCR za vzniku specifických produktů

11.2 Doplněk stravy Linex® Forte

11.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 3 tablet Linex® Forte podle kapitoly 5.3.2. Část hrubého lyzátu byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu. Výsledek agarózové gelové elektroforézy hrubého lyzátu buněk je uveden na obrázku 11-3.



Obrázek 11-3 Agarózová gelová elektroforéza hrubého lyzátu buněk z doplňku stravy Linex® Forte

⇒ DNA byla na gelu přítomna.

11.2.2 Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic

DNA z hrubého lyzátu byla izolována v magnetickém separátoru pomocí magnetických mikročastic (viz kapitola 5.7). Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 25 μ l TE pufru a podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace a čistoty na přístroji NanoPhotometer®. Měření bylo prováděno s LID 10, množství nanášené DNA bylo 3 μ l.

Výsledky izolace DNA pomocí částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných mikročastic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal jsou uvedeny v tabulce 11-3.

Tabulka 11-3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované pomocí magnetických částic MPG® Uncoated, hypersíťovaných částic, částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

Částice	c [ng· μ l ⁻¹]	Absorbance [-]				$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ [-]	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ [-]	m [μ g]
		$A_{230\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{320\text{nm}}$			
MPG	281	0,66	0,69	0,43	0,12	1,84	1,04	7,0
HPS	156	0,29	0,36	0,21	0,05	1,93	1,31	3,9
Fkol	120	0,30	0,30	0,19	0,06	1,82	1,03	3,0
DB	72	0,19	0,16	0,08	0,01	2,07	0,80	1,8

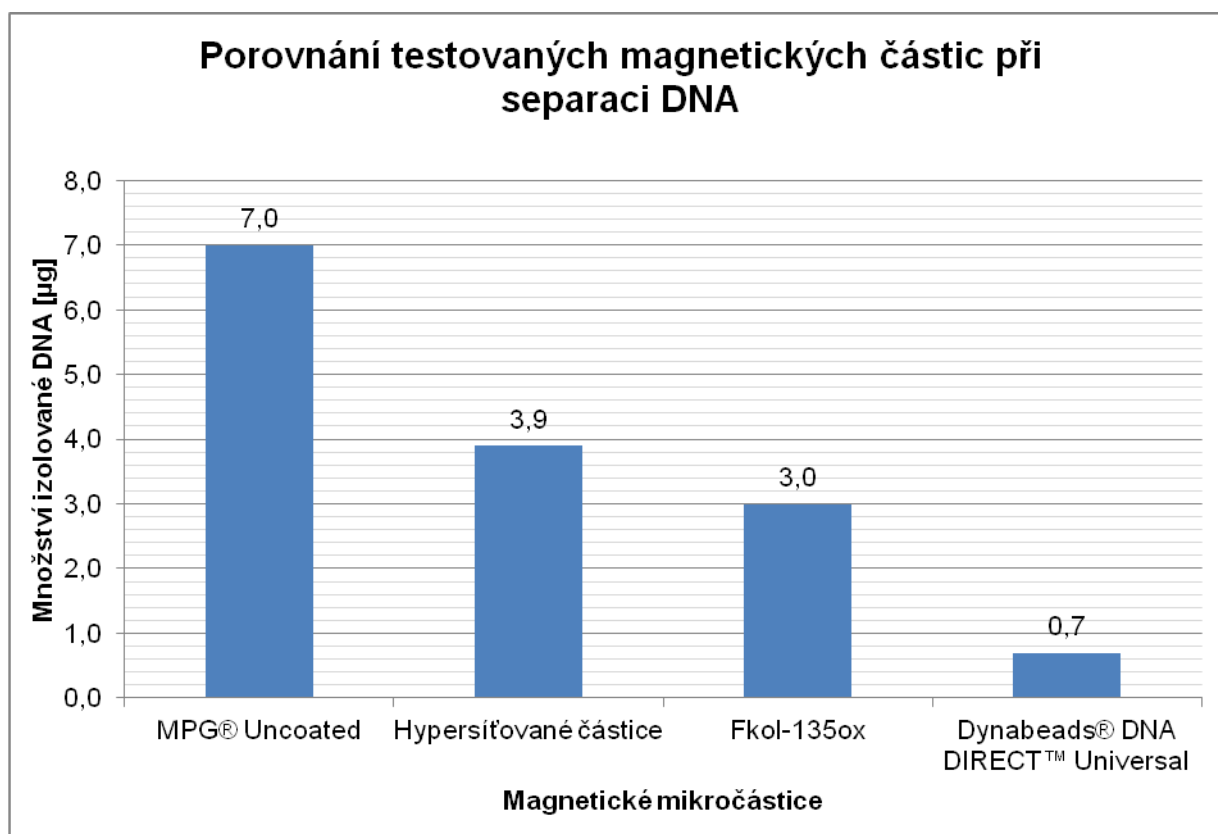
Vz. – číslo vzorku, Vz₀ – číslo výchozího vzorku, c – koncentrace izolované DNA, m – hmotnost izolované DNA, m₀ – hmotnost DNA v separačním roztoku

DNA byla izolována v koncentraci $72\text{--}281\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

⇒ Izolováno bylo $1,8\text{--}7,0\mu\text{g}$ DNA.

11.2.3 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA z doplňku stravy Linex® Forte

Účinnost magnetických mikročástic při separaci DNA v magnetickém separátoru pro jednotlivé typy magnetických mikročástic je znázorněna v grafu 11-2.



Graf 11-2 Porovnání testovaných magnetických částic při separaci DNA

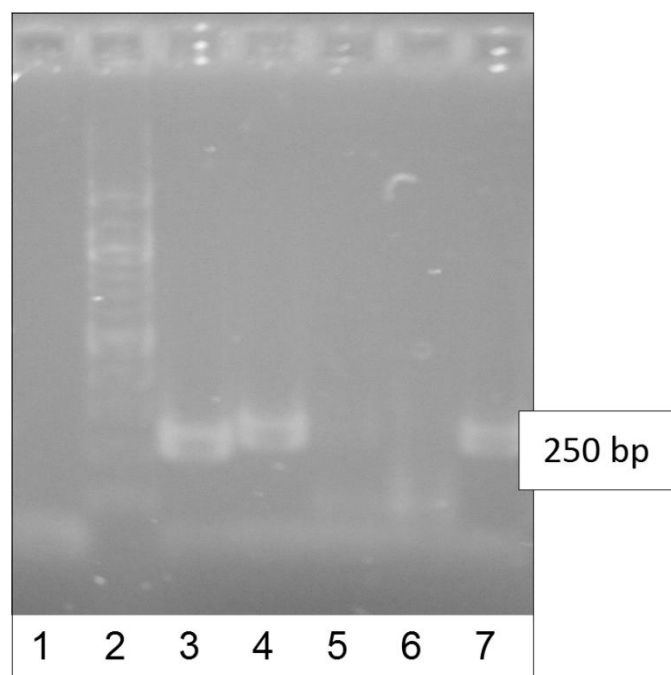
Největší množství DNA bylo izolováno částicemi MPG® Uncoated. Množství izolované DNA bylo $7,0\mu\text{g}$.

⇒ Při separaci DNA z mléčného výrobku Actimel byly neúčinnější částice MPG® Uncoated.

11.2.4 Amplifikace DNA v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná magnetickými mikročásticemi v magnetickém separátoru byla naředěna na koncentraci $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí PCR s primery LbLMA1-rev a R16-1 podle postupu uvedeného v kapitole 5.11. Do směsi pro PCR bylo pipetováno $10\mu\text{l}$ DNA. Pro zachování objemu PCR směsi bylo množství vody pro PCR sníženo na $10\mu\text{l}$.

Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy (viz obrázek 11-4). Vyhodnocení intenzity produktů PCR je uvedeno v tabulce 11-4. Fragmenty měly stejnou délku jako pozitivní kontrola a délka byla přibližně 250bp. Specifické fragmenty hypersíťovaných částic a částic Fkol-135ox jsou na fotografii málo patrné, ale na gelu byly přítomny.



Obrázek 11-4 Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (250bp)

Tabulka 11-4 Vyhodnocení průběhu PCR (doplněk stravy Linex® Forte)

Běh	Popis	Detekce PCR produktu
1	Negativní kontrola	-
2	Žebříček 100bp	-
3	Pozitivní kontrola	+
4	MPG® Uncoated	+
5	Hypersíťované mikročástice	(+)
6	Fkol-135ox	(+)
7	Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal	+

- produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl detekován, (+) produkt PCR byl slabě detekován

⇒ DNA se v PCR amplifikovala za vzniku specifických produktů. Intenzita produktů PCR pro DNA získanou izolací hypersíťovanými částicemi a částicemi Fkol-135ox byla nízká.

DISKUZE

Metoda PCR se stále častěji uplatňuje v potravinářském průmyslu, např. při stanovení patogenů v potravinách. Citlivost však může být ovlivněna přítomností extracelulárních i intracelulárních inhibitorů [60], které mohou být příčinou falešně negativních výsledků, nebo znečištěním, které může vést k falešně pozitivním výsledkům [60]. Hlavním požadavkem pro správný průběh PCR je získání DNA v dostatečném množství i kvalitě, což může být obtížné zvláště při izolaci DNA z komplexních vzorků (např. půdy, znečištěné vody, stolice, krve, potravin, apod.). Velmi důležitá je tedy volba vhodné metody pro separaci DNA. Nejčastěji se používá fenol-chloroformová extrakce, chromatografické metody [62] nebo separace DNA pomocí magnetických nosičů [63].

V souladu s cílem práce byla hlavní pozornost zaměřena na ověření vhodnosti použití nových typů magnetických nosičů při izolaci DNA.

12 Výběr a kultivace bakteriálních kmenů

Bakterie kmene *L. fermentum* CCM 7192^T, *L. johnsonii* CCM 2935^T, *L. rhamnosus* CCM 1825^T a *L. sakei* IM398 byly kultivovány v tekutém živném médiu a po kultivaci byla měřena optická hustota nárůstu buněk.

Čistota kultur byla ověřena křížovým roztěrem. Na médiu narostly bílé lesklé bakteriální kolonie o přibližně stejné velikosti. Tento vzhled je popisován i v literatuře [64], můžeme tedy předpokládat, že bakteriální kultura byla čistá.

Z testovaných kultur byl připraven hrubý lyzát a provedena fenol-chloroformová extrakce DNA. Izolovaná DNA byla amplifikována v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agaróзовé gelové elektroforézy. Relativní mobilita amplifikovaného fragmentu DNA odpovídala relativní mobilitě fragmentu pozitivní kontroly. Velikosti obou fragmentů se shodovaly a jejich délka byla stanovena na 250bp (viz graf 6-1). Amplifikoval se produkt specifický pro rod *Lactobacillus*, bylo tedy prokázáno, že testované kmeny byly rodu *Lactobacillus* [61].

Na základě stanovení optické hustoty buněk (měření absorbance při 600nm), koncentrace DNA a ověření kvality DNA pomocí PCR byl jako nejvhodnější kandidát pro izolaci DNA vybrán kmen *L. rhamnosus* CCM 1825^T. Kultura tohoto kmene narostla do největší optické hustoty (0,905) a současně z ní bylo izolováno největší množství DNA (111,8μg).

13 Testování magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace

Efektivita a účinnost magnetických mikročastic při separaci DNA byla testována s DNA kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T. Tato DNA byla získána fenol-chloroformovou extrakcí z buněčné kultury narostlé v tekutém MRS médiu. Testovány byly magnetické mikročastice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťované magnetické částice. Počáteční koncentrace DNA byla ~ 1 000 ng·μl⁻¹, výchozí množství DNA bylo ~ 26,0 μg. Koncentrace magnetických častic byla 2 mg·ml⁻¹. V případě magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal byla ponechána výchozí koncentrace častic (výrobce přesnou koncentraci neuvádí).

Největší množství DNA bylo izolováno pomocí hypersíťovaných magnetických mikročastic (návratnost DNA byla 9,1 %). Velkou návratnost DNA měly také částice MPG® Uncoated (8,9 %). Nejúčinnější byly tedy porézní částice.

Poměr absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} u magnetických mikročastic MPG® Uncoated a hypersíťovaných magnetických častic se pohyboval těsně nad hodnotou 2,0, u magnetických častic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal ležel v rozmezí 1,8–2,0, což značí vysokou čistotu DNA [32]. Nízký poměr absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} vykazovala DNA izolovaná pomocí

magnetických mikročastic Fkol-135ox (~ 1,64), což vypovídá o kontaminaci eluátu proteiny [32]. Lze proto předpokládat, že částice Fkol-135ox mají vysokou afinitu k proteinům.

Kvalita DNA izolované testovanými částicemi byla prokázána v PCR specifické pro rod *Lactobacillus*. Ve všech testovaných případech byl pomocí agarózové gelové elektroforézy detekován specifický produkt PCR (250 bp) [61]. V případě magnetických mikročastic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal byl produkt PCR detekován slabě. Nízká intenzita specifického fragmentu mohla být způsobena nesprávným ředěním DNA při přípravě směsi pro PCR.

14 Testování různých množství magnetických mikročastic při izolaci DNA jedné koncentrace

Závislost množství eluované DNA na koncentraci magnetických částic v separačním roztoku byla testována pomocí DNA kmene *L. rhamnosus* CCM 1825^T. DNA byla separována fenol-chloroformovou extrakcí z buněčné kultury narostlé v tekutém MRS médiu. Porovnávány byly magnetické mikročastice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťované magnetické částice. Počáteční koncentrace DNA byla ~ 2 700 ng·μl⁻¹. Výchozí množství DNA bylo ~ 90,0 μg. Porovnávána byla návratnost DNA při koncentraci magnetických mikročastic 5 mg·ml⁻¹ (2,5násobná koncentrace), 2 mg·ml⁻¹ (výchozí koncentrace), 1 mg·ml⁻¹ (poloviční koncentrace) a 0,5 mg·ml⁻¹ (čtvrtinová koncentrace).

Při výchozí, poloviční a čtvrtinové koncentraci magnetických mikročastic vykazovaly největší návratnost DNA hypersíťované částice a částice Fkol-135ox. Při 2,5násobné koncentraci vykazovaly největší návratnost částice MPG® Uncoated a částice Fkol-135ox. Nejúčinnější byly tedy porézní částice a částice funkcionalizované skupinami –COOH.

DNA izolovaná testovanými částicemi různých koncentrací vykazovala poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ vyšší než 1,8, což značí dobrou čistotu DNA a minimální kontaminaci proteiny [32]. Nízký poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ vykazovala DNA izolovaná pomocí magnetických mikročastic Fkol-135ox, což potvrzuje závěr kapitoly 13 – lze předpokládat, že částice Fkol-135ox mají vysokou afinitu k proteinům.

Podle původního předpokladu klesala procentuální návratnost DNA s poklesem koncentrace testovaných magnetických mikročastic.

Kvalita DNA izolované testovanými částicemi byla prokázána v PCR specifické pro rod *Lactobacillus*. Ve všech případech byl pomocí agarózové gelové elektroforézy detekován specifický produkt PCR (250 bp) [61].

15 Testování magnetických mikročastic jedné koncentrace při izolaci DNA různých koncentrací

Závislost množství eluované DNA na výchozím množství DNA v separačním roztoku byla testována pomocí DNA z kuřecích erytrocytů. Porovnávány byly magnetické mikročastice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťované magnetické částice o výchozí koncentraci (2 mg·ml⁻¹). Počáteční koncentrace DNA byla ~ 4 000, 2 000, 1 000, 500, 250, 125 a 62,5 ng·μl⁻¹, což odpovídá výchozímu množství DNA v separačním roztoku ~ 100,0, 50, 25, 12,5, 6,8, 3,4 a 1,7 μg.

Procentuální návratnost DNA rostla s klesající výchozí koncentrací DNA. Tento jev byl nejvíce patrný u magnetických mikročastic Fkol-135ox, ze kterých se při výchozí koncentraci DNA 62,5 ng·μl⁻¹ elovalo více než 70 % DNA. Porézní částice (částice MPG® Uncoated a hypersíťované částice) vykazovaly vzhledem k výchozí koncentraci DNA proměnlivou návratnost.

DNA izolovaná testovanými částicemi vykazovala poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ vyšší než 1,8 a nižší než 2,0, což značí vysokou čistotu DNA a minimální kontaminaci proteiny

[32]. Nízký poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ vykazovala DNA izolovaná pomocí magnetických mikročásteček Fkol-135ox, což opět potvrzuje předpoklad z kapitoly 13, že částice Fkol-135ox mají vysokou afinitu k proteinům. Nízký poměr absorbancí měla také DNA izolovaná hypersíťovanými částicemi z roztoku DNA o výchozí koncentraci $62,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Tuto situaci lze vysvětlit nízkou koncentrací eluované DNA a nízkými hodnotami absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm. I malá nepřesnost měření tak mohla způsobit velkou chybu při výpočtu poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

16 Určení afinity magnetických mikročásteček k RNA

Afinita magnetických mikročásteček k RNA byla testována s kvasinkovou RNA. Testovány byly magnetické mikročástečky Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťované magnetické částice. Počáteční koncentrace RNA byla $\sim 3\,000$, $2\,000$, $1\,000$ a $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, což odpovídá výchozímu množství RNA ~ 75 , 50 , 25 a $12,5 \mu\text{g}$. Testování probíhalo s výchozí koncentrací magnetických částic ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Největší množství RNA bylo eluováno z magnetických částic Fkol-135ox a to při výchozí koncentraci RNA $12,5 \mu\text{g}$ ($10,0\%$). Nejmenší množství RNA bylo eluováno z magnetických mikročásteček Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal.

Porovnáním množství eluované kvasinkové RNA s množstvím eluované DNA z kuřecích erytrocytů při stejných koncentracích bylo zjištěno, že testované mikročástečky mají 2–7krát menší afinitu k RNA než k DNA.

17 Porovnání různých druhů magnetických částic při izolaci DNA z mléčných výrobků

Schopnost magnetických mikročásteček izolovat DNA z komplexních vzorků v kvalitě vhodné pro PCR byla ověřena s mléčným výrobkem Actimel a doplňkem stravy Linex® Forte. Testovány byly magnetické mikročástečky Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, MPG® Uncoated, Fkol-135ox a hypersíťované magnetické částice o výchozí koncentraci ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Největší množství DNA z mléčného výrobku Actimel bylo izolováno pomocí částic MPG® Uncoated ($1,0 \mu\text{g}$) a částic Fkol-135ox ($1,0 \mu\text{g}$). Při izolaci DNA z doplňku stravy Linex® Forte byly nejúčinnější částice MPG® Uncoated ($7,0 \mu\text{g}$).

Poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ u DNA izolovaného testovanými mikročástečkami z mléčného výrobku Actimel byl výrazně nižší než $1,8$, což svědčí o kontaminaci proteiny [32]. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ u DNA izolovaného testovanými mikročástečkami z doplňku stravy Linex® Forte naopak ležel v rozmezí $1,8$ – $2,0$. Izolovaná DNA tedy měla čistotu vhodnou pro PCR.

Kvalita DNA izolované testovanými částicemi z výrobku Actimel a Linex® Forte byla ověřena v PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. V případě mléčného výrobku Actimel byl specifický produkt PCR (250 bp) detekován u DNA izolované pomocí magnetických částic Fkol-135ox a částic Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal [61]. DNA izolovaná všemi testovanými částicemi z doplňku stravy Linex® Forte byla amplifikována za vzniku specifického produktu PCR. Fragment po amplifikaci v PCR z DNA izolované pomocí hypersíťovaných magnetických částic a částic Fkol-135ox byl však málo intenzivní.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na porovnání efektivity magnetických mikročastic při izolaci DNA. Porovnávány byly 4 druhy magnetických mikročastic: Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal na bázi polystyrenu, MPG® Uncoated na bázi porézního skla, magnetické neporézní P(HEMA-co-GMA) částice Fkol-135ox funkcionalizované karboxylovými skupinami a hypersíťované styren (St)-divinylbenzenové (DVB) částice s vysokým specifickým povrchem.

Byl studován vliv koncentrace částic a vliv koncentrace DNA ve vzorku na množství eluované DNA. Dále byla studována afinita magnetických mikročastic k RNA v závislosti na koncentraci RNA ve vzorku. Schopnost částic izolovat DNA z komplexních vzorků byla ověřena na mléčném výrobku Actimel a doplňku stravy Linex® Forte.

Bylo potvrzeno, že s rostoucí koncentrací magnetických mikročastic roste i množství eluované DNA. Bylo zjištěno, že procentuální návratnost DNA klesá s rostoucí koncentrací DNA ve vzorku (absolutní množství eluované DNA podle předpokladů s rostoucí koncentrací DNA ve vzorku roste). Bylo ověřeno, že afinita magnetických mikročastic k RNA klesá s rostoucí koncentrací RNA ve vzorku (absolutní množství eluované RNA podle předpokladů s rostoucí koncentrací RNA ve vzorku roste). Současně bylo zjištěno, že v závislosti na koncentraci DNA a RNA ve vzorku a typu magnetických mikročastic mají magnetické mikročastice 2–7krát nižší afinitu k RNA než k DNA.

Izolovat DNA z mléčného výrobku Actimel v kvalitě vhodné pro PCR se podařilo pouze s magnetickými mikročasticemi Fkol-135ox a Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal. Z doplňku stravy Linex® Forte byla DNA izolována v kvalitě vhodné pro PCR všemi testovanými magnetickými mikročasticemi.

Velmi dobré separační vlastnosti a velké množství izolované DNA při vyšších koncentracích DNA ve vzorku měly hypersíťované styren (St)-divinylbenzenové (DVB) částice s vysokým specifickým povrchem. Pro izolaci DNA ze vzorků s nízkou koncentrací DNA je vhodnější použít magnetické neporézní P(HEMA-co-GMA) částice Fkol-135ox nebo komerční částice Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal. Pro rutinní využití hypersíťovaných styren (St)-divinylbenzenových (DVB) částic a částic MPG® Uncoated při analýze reálných vzorků je třeba metodu izolace dále optimalizovat.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ADAMS, M. R. a NOUT, M. J. R. *Fermentation and food safety*. 1. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2001. ISBN 0-8342-1843-7.
- [2] ZBOŘIL, V., PROKOPOVÁ, L. a HERTLOVÁ, M. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. ISBN 80-247-0584-2.
- [3] PARVEZ, S., et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2006, vol. 100, no. 6, p. 1171-1185 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1364-5072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>.
- [4] DEANGELIS, M. M., et al. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research* [online]. 1995, vol. 23, no. 22, p. 4742-4743 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/23.22.4742. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/23.22.4742>.
- [5] KIRBY, K. S. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochemical Journal*. 1957, vol. 66, p. 495-504. ISSN 0264-6021.
- [6] KIRBY, K. S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochemical Journal*. 1956, vol. 64, p. 405-408. ISSN 0264-6021.
- [7] BOWTELL, D. a SAMBROOK, J. *DNA Microarrays: A molecular cloning Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. ISBN 0-87969-624-9.
- [8] GIJS, M. A. M., et al. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 1995, vol. 23, no. 22 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1613-4982. DOI: 10.1007/s10404-004-0010-y. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10404-004-0010-y>.
- [9] HORÁK, D., et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, vol. 30, no. 11, p. 1751-1772 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1615-9306. DOI: 10.1002/jssc.200700088. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>.
- [10] TRACHTOVÁ, Š. *Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. BRNO, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Vedoucí dizertační práce Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [11] LU, A.-H., SALABAS, E. L. a SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007-02-12, vol. 46, no. 8, p. 1222-1244 [cit. 2012-05-03]. ISSN 14337851. DOI: 10.1002/anie.200602866. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>.
- [12] MCBAIN, S. C., HUMPREY, H. P. Y. a DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. Vol. 3, p. 169- 180 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1178-2013. DOI: 10.2147/IJN.S1608. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>.

- [13] WU, W., HE, Q. a JIANG, CH. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2008, vol. 3, no. 11, p. 397-415 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1931-7573. DOI: 10.1007/s11671-008-9174-9. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11671-008-9174-9>.
- [14] HAWKINS, T. L., O'CONNOR-MORIN, T. a SANTILLAN, C. DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase. *Nucleic Acids Research* [online]. 1994, vol. 22, no. 21, p. 4543-4544 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/content/22/21/4543.extract>.
- [15] SARKAR, T. R., IRUDAYARAJ, J. a JIANG, CH. Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Analytical Biochemistry* [online]. 2008-08-01, vol. 379, no. 1, p. 130-132 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2008.04.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269708002261>.
- [16] MELZAK, K. A., IRUDAYARAJ, J. a JIANG, CH. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1996-08-10, vol. 181, no. 2, p. 635-644 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00219797. DOI: 10.1006/jcis.1996.0421. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197979690421X>.
- [17] RITTICH, B., et al. Separation of PCR-ready DNA from Dairy Products using Magnetic hydrophilic Microspheres and Poly(ethyleneglycol)-NaCl water Solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2009, vol. 321, no. 10, p. 1667-1670 [cit. 2012-05-05]. ISSN 03048853. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.02.110. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885309001784>.
- [18] RAMANATHAN, et al. Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chemistry of Materials* [online]. 2005, vol. 17, no. 6, p. 1290-1295 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0897-4756. DOI: 10.1021/cm048357f. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm048357f>.
- [19] HORÁK, D., RITTICH, B. a ŠPANOVÁ, A. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2007, vol. 311, no. 1, p. 249-254 [cit. 2012-05-03]. ISSN 03048853. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1157. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025418>.
- [20] LEE, J. a CHANG, J. H. Magnetic DNA Separation Process with Functionalized Magnetic Silica Nanoparticles. In: Korea Institute of Ceramic Engineering & Technology. *Proceedings of SPIE*. 2008, Seoul, Korea. 153-801 [online]. 2008, vol. 7270 [cit. 2012-05-03]. DOI: 10.1117/12.814120. Dostupné z: <http://144.206.159.178/ft/CONF/16424201/16424237.pdf>.
- [21] YANG, CH., et al. Surface Functionalization and Characterization of Magnetic Polystyrene Microbeads. *Langmuir* [online]. 2008, vol. 24, no. 16, p. 9006-9010 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la7040604. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la7040604>.
- [22] HÄFELI, U., et al. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. New York: Plenum Press, 1997. ISBN 0-306-45687-7.

- [23] ZHU, L-Z., et al. Extraction and Detection of mRNA from a Single K562 Cell Based on the Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles. *Chinese Journal of Chemistry* [online]. 2008, vol. 26, no. 6, p. 1041-1044 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1001604x. DOI: 10.1002/cjoc.200890185. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cjoc.200890185>.
- [24] YEUNG, S. W. a HSING, I-M. Manipulation and extraction of genomic DNA from cell lysate by functionalized magnetic particles for lab on a chip applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2006, vol. 21, no. 7, p. 989-997 [cit. 2012-05-03]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2005.03.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566305000886>.
- [25] PEČOVÁ, M, et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, roč. 105, s. 524 - 530. ISSN 1213-7103.
- [26] HORÁK, D., et al. Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA. *European Polymer Journal* [online]. 2011, vol. 47, no. 5, p. 1090-1096 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305711000607>.
- [27] ŠPANOVÁ, A., et al. Immunomagnetic separation and detection of Salmonella cells using newly designed carriers. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, vol. 1009, no. 1-2, p. 215-221 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00431-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730300431X>.
- [28] TAHA, E.G. et al. Rapid Detection of Salmonella in Chicken Meat Using Immunomagnetic Separation, CHROMagar, ELISA and Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *International Journal of Poultry Science* [online]. 2010-9-1, vol. 9, no. 9, p. 831-835 [cit. 2012-05-03]. ISSN 16828356. DOI: 10.3923/ijps.2010.831.835. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ijps.2010.831.835>.
- [29] VASILEVSKAYA, V. V. et al. Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1995, vol. 102, no. 16, p. 6595-6602 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00219606. DOI: 10.1063/1.469375. Dostupné z: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v102/i16/p6595/s1>.
- [30] KRÍŽOVÁ, J. et al. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, vol. 1064, no. 2, p. 247-253 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304022551>.
- [31] KLEIDEITER, G., et al. Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions. Theoretical considerations. *Polymer* [online]. 1999, vol. 40, no. 14, p. 4013-4023 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00643-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386198006430>.
- [32] KEER, J. T. a BIRCH, L. *Essentials of Nucleic Acid Analysis*. 1. vyd. Cambridge, UK: LGC Limited, 2008. S. 83 - 88. ISBN 978-0-85404-367-5.
- [33] Implen GmbH. NanoPhotometer User Manual. [manuál] 2.2, Schatzbogen, Německo, 2006.

- [34] ROBERTSON, J., ROSS, A. M. a BURGOYNE, L. A. *DNA in Forensic Science*. Taylor & Francis e-Library, 2002. ISBN 0-203-015150-0.
- [35] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [36] LIU, S., et al. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International* [online]. 2011, vol. 44, no. 3, p. 643-651 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911000056>.
- [37] BERGEY, D. H. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2001. ISBN 978-038-7950-419.
- [38] MARIANSKI, S. a MARIANSKI, A. *The Art of Making Fermented Sausages*. 2nd ed. Bookmagic, LLC, 2009. ISBN 978-0-9824267-1-5.
- [39] VAUGHAN, E. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1999-10-01, vol. 10, no. 5, p. 505-510 [cit. 2012-05-03]. ISSN 09581669. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00018-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816699900018X>.
- [40] SALMINEN, S., DEIGHTON, M. a GORBACH, S. *Lactic acid bacteria in health and disease*. New York: Marcel Dekker, 1998. ISBN 0824701331.
- [41] OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. a ISOLAURI, E. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 1996-08-10, vol. 82, 1/4, p. 279-289 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0003-6072. DOI: 10.1023/A:1020620607611. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?id=doi:10.1023/A:1020620607611>.
- [42] Zákon č. 77/2003 Sb. ze dne 6. Března 2003, Vyhláška ministerstva zemědělství ČR. In: *Sbírka zákonů* 27. 3. 2003, 2003.
- [43] WINKLEROVÁ, D. OSTRÝ, V. a RUPRICH, J. Informace Vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Doplnky stravy a PNT. *Státní zdravotní ústav* [online]. 2006 [cit. 2012-04-27]. Dostupné z: http://http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2005_6_deklas_DS_PNT_rev1.pdf.
- [44] FRIČ, P., SALMINEN, S. a ISOLAURI, E. Probiotics in Gastroenterology: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Zeitschrift für Gastroenterologie* [online]. 1996-08-10, vol. 40, no. 3, p. 197-201 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00442771. DOI: 10.1055/s-2002-22328. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-22328>.
- [45] BORTLÍK, M. Probiotika v gastroenterologii. *Remedia* [online]. 2009, roč. 1 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.remmedia.cz/Okruhy-temat/Gastroenterologie/Probiotika-v-gastroenterologii/8-12-yl.magarticle.aspx>.
- [46] LJUNGH, A a TORDEL, W. *Lactobacillus Molecular Biology From Genomics to Probiotics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-41-7.
- [47] TIMMERMAN, H. N. *Multispecies Probiotics - Composition and Functionality*. UTRECHT, 2006. Dizertační práce. University of Utrecht. Vedoucí dizertační práce Beynen, A. C.
- [48] CARTWRIGHT, By Peter. *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Editor Baltasar Mayo, Douwe van Sinderen. Norfolk: Caister Academic, c2010,. ISBN 978-190-4455-684.

- [49] CARTWRIGHT, P. *Probiotics for Crohn's and Colitis*. Ilford: Prentice Publishing, 2003. ISBN 0-9544438-0-2.
- [50] CHATTERJI, A. K. *Introduction To Environmental Biotechnology*. 2. vyd. New Delhi: Prentice-Hall of India Pvt. Ltd., 2007. ISBN 978-81-203-3160-0.
- [51] HARRIGAN, W. F. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3. vyd. Bridgend: Gulf Professional Publishing, 1998. ISBN 0-12-326043.
- [52] VASANTHAKUMARI, R. *Practical Microbiology*. New Delhi: BI Publications Pvt Ltd, 2009. ISBN 978-81-7225-318-9.
- [53] SAIJ-JIMENEZ, C. *Molecular biology and cultural heritage: proceedings of the International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage, 4-7 March 2003, Sevilla, Spain* [online]. Exton, Pa.: Balkema, 2003 [cit. 2012-05-03]. ISBN 90-580-9555-X.
- [54] CODÓN, A. C. a BENITEZ, T. Variability of the Physiological Features and of the Nuclear and Mitochondrial Genomes of Baker's Yeasts. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 1995, vol. 18, no. 3, p. 343-352 [cit. 2012-05-03]. ISSN 07232020. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80426-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202011804261>.
- [55] MAURER, J. *PCR Methods in Foods: a story of biotechnology*. 1st ed. New York: Springer Science + Business Media, Inc., 2006. ISBN 0-387-28264-5.
- [56] SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase: light in the intestinal tract tunnel. *Science* [online]. 1988-01-29, vol. 239, no. 4839, p. 487-491 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.2448875. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2448875>.
- [57] RABINOW, P. *Making PCR: a story of biotechnology*. 1. vyd. Chicago: University of Chicago Press, 1996. ISBN 0226701476.
- [58] CLARK, D. P. *Molecular biology*. 1. vyd. Boston: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 0-12-175551-7.
- [59] ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [60] WILSON, I. G. Minireview: Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1997, vol. 63, 10, s. 3741 – 3751 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.mendeley.com/research/inhibition-facilitation-nucleic-acid-amplification-1/#>. ISSN 1098-5336
- [61] DUBERNET, S., DESMASURES, N. a GUÉGUEN, M. A. PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007-02-12, vol. 214, no. 2, p. 271-275 [cit. 2012-05-03]. ISSN 03781097. DOI: 10.1016/S0378-1097(02)00895-9. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(02\)00895-9](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(02)00895-9).
- [62] PRAZERES, D. M. F., et al. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography: light in the intestinal tract tunnel. *Science* [online]. 1988-01-29, vol. 239, no. 4839, p. 487-491 [cit. 2012-05-03]. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01254-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967397012545>.

- [63] RITTICH, B., et al. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles: light in the intestinal tract tunnel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2006, vol. 52, no. 2, p. 143-148 [cit. 2012-05-03]. ISSN 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776506001457>.
- [64] CHUMCHALOVÁ, J., et al. Miniatlas mikroorganismů. *Miniatlas mikroorganismů*. [online] [cit. 2012-04-29]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/>.
- [65] BacMap Genome atlas. *Lactobacillus brevis* ATCC 367 [online]. 2012 [cit. 2012-04-27]. Dostupné z: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/390>.
- [66] BacMap Genome atlas. *Bifidobacterium longum subsp. infantis* 157F [online]. 2012 [cit. 2012-04-27]. Dostupné z: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/1269>.
- [67] HOUCK, M. M. a SIEGEL, J. A. *Fundamentals of Forensic Science*. 2nd ed. Burlington: Academic Press, 2010. ISBN 978-0123567628

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	páry bází
CCM	z anglického Czech Collection of Microorganisms
CIZ	chloroform-isoamylalkohol
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát
MPG	z anglického Magnetic Porous Glass
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
P(HEMA-co-GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
RNA	kyselina ribonukleová
SDS	dodecylsulfát sodný
TE	Tris-EDTA pufr
T _m	teplota tání

SEZNAM PŘÍLOH

1. Poster prezentovaný na konferenci Výživa, potraviny a zdravý životní styl, Brno, 14.–15. 4. 2012.

Využití magnetických mikročastic pro izolaci DNA

Jelínek, Z.¹, Horák, D.², Šálek, P.², Rittich, B.¹, Španová, A.¹

Email: xcjelinek@fch.vutbr.cz

¹Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ČR

²Ústav makromolekulární chemie Akademie věd ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ČR

Úvod

K identifikaci bakteriálních druhů se používají molekulárně-diagnostické metody založené na amplifikaci genomové DNA, např. polymerázová řetězová reakce (PCR).

Při analýze komplexních vzorků bývá citlivost PCR ovlivněna přítomností intra- i extracelulárních inhibitorů, zejména proteinů, enzymů nebo fenolu. Extrakce DNA z biologického materiálu je tedy klíčovým krokem celé analýzy.

Klasická fenol-chloroformová extrakce sice umožňuje získat DNA ve vysoké koncentraci a kvalitě vhodné pro PCR, ale tato metoda je velmi zdlouhavá a častá centrifugace a dělení fází prakticky znemožňují automatizaci. Kromě toho je nutné použití toxických rozpouštědel.

Neřady klasických metod řeší použití magnetických mikročastic pro izolaci DNA. Metoda je rychlá, plně automatizovatelná a poskytuje DNA v dostatečné koncentraci a čistotě [1].

Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat efektivitu různých typů magnetických mikročastic při izolaci bakteriální DNA. Dále byla sledována adsorpce RNA mikročasticemi a byla ověřena použitelnost izolované DNA v PCR.

Materiál a metody

Materiál:

Částice Dynabeads DNA DIRECT Universal (Dyna, Norsko), MPG Uncoated (PureBiotech, New Jersey, USA), Fkol-135ox a hypersíťované částice (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha), 40% PEG 6000, 5 M NaCl, 70% ethanol, TE pufr. DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí z bakteriálního kmene *L. rhannosus* CCM 1825^T z České sbírky mikroorganismů, Brno, Česká republika.

Metody:

Extrakce pomocí mag. částic: Ke 100 μ l 5M NaCl bylo přidáno 25 μ l DNA ($3,6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), 100 μ l 40% PEG 6000 a 25 μ l magnetických mikročastic. Směs byla inkubována 5 minut a potom 15 minut separována na magnetickém separátoru. Supernatant byl odpipetován a zbylý analyt 2krát promyt 350 μ l 70% ethanolu a vysušen v exsikatoru. DNA byla eluována přes noc do 25 μ l TE pufru. Izolovaná DNA byla použita pro PCR specifickou pro rod *Lactobacillus*.

Výsledky a diskuze

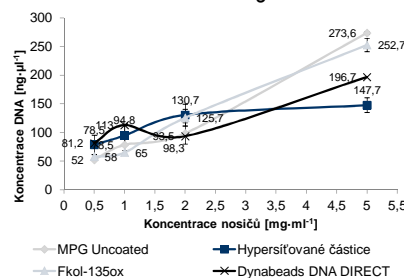
Efektivita magnetických mikročastic adsorbovat DNA byla měřena s částicemi o koncentracích $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Koncentrace částic Dynabeads DNA DIRECT není výrobcem udávána. Částice proto byly použity jako 4 \times a 2 \times ředěné, neředěné a 2,5 \times koncentrované. Závislost koncentrace izolované DNA na koncentraci mikročastic byla vynesena do Grafu 1. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 1.

V nízkých koncentracích magnetických mikročastic ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) se jako neefektivnější ukázaly hypersíťované částice. Zvýšení koncentrace nad $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ již nevedlo k výrazně lepším výsledkům. Při koncentraci $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ měly vyšší výtěžnost všechny ostatní testované nosiče.

Zajímavý byl průběh křivky u magnetických mikročastic Dynabeads DNA DIRECT, které vykazují při koncentraci dodávané výrobcem téměř nejvyšší výtěžek DNA, který ale s dalším zvyšováním koncentrace výrazně narůstá.

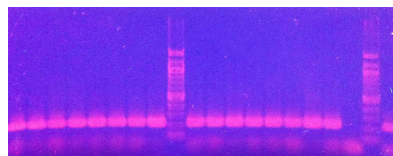
Izolovaná DNA se amplifikovala v PCR (Obrázek 1). Pro všechny vzorky byl amplifikován produkt o velikosti 250 bp. Vzorky tedy obsahovaly DNA rodu *Lactobacillus*.

Graf 1: Závislost koncentrace izolované DNA na koncentraci mag. nosičů



Tabulka 1: Koncentrace izolované DNA.

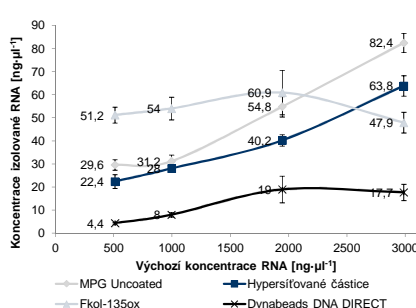
C _{nosičů} [mg·ml ⁻¹]	C _{izolované DNA} [ng·μl ⁻¹]			
	MPG	HPS	Fkol	DB
5	273,6	147,7	252,7	196,7
2	98,3	130,7	125,7	93,5
1	78,5	94,8	65	113
0,5	52	78,5	58	81,2



Obrázek 1: Gelová elektroforéza produktů PCR

Afinita mikročastic k RNA byla zjišťována s kvasinkovou RNA o koncentraci $2987 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $1945 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $995 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $510 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Koncentrace použitých magnetických částic byla $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ resp. částice nebyly ředěny (Dynabeads DNA DIRECT). Výsledky jsou uvedeny v Grafu 2 a Tabulce 3.

Graf 2: Závislost koncentrace izolované RNA na koncentraci RNA ve vzorku



Tabulka 3: Koncentrace izolované RNA

C _{východí} [ng·μl ⁻¹]	C _{koncová} [ng·μl ⁻¹]			
	MPG	HPS	Fkol	DB
2987	82,4	63,8	47,9	17,7
1945	54,8	40,2	60,9	19
995	31,2	28	54	8
510	29,6	22,4	51,2	4,4

Nejnižší afinitu k RNA měly částice Dynabeads DNA DIRECT a to v celém rozmezí testovaných koncentrací. Při koncentraci částic $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ měly nejvyšší afinitu k RNA částice Fkol-135ox. Při koncentraci $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ měly nejvyšší afinitu k RNA částice MPG Uncoated.

Závěr

Bylo prokázáno, že množství izolované DNA závisí na výchozí koncentraci magnetických mikročastic. Tato závislost není lineární a pro hypersíťované částice platí, že další zvyšování koncentrace částic nad $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ již nevede k vyšším výtěžkům DNA. Lineární závislost vztahu vykazovaly částice MPG Uncoated a Fkol-135ox.

Afinita k RNA byla v případě magnetických mikročastic velmi nízká a tvořila asi 1/5 afinity k DNA. Nejmenší afinitu měly komerční Dynabeads DNA DIRECT, největší naopak částice Fkol-135ox.

Množství izolované RNA záviselo na výchozí koncentraci.

Použitá literatura

[1] DeAngelis, M. M., Wang, D. G. a Hawkins, T. L. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acid Research*. 1995, Sv. 23, 22.